

CARLA FERNANDA FÁVARO

ECOLOGIA QUÍMICA DOS PERCEVEJOS *Agroecus griseus*, *Pallantia macunaima*
E *Pellaea stictica* (Heteroptera: Pentatomidae)

Curitiba, 2012



CARLA FERNANDA FÁVARO

ECOLOGIA QUÍMICA DOS PERCEVEJOS *Agroecus griseus*, *Pallantia macunaima*

E *Pellaea stictica* (Heteroptera: Pentatomidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química, Área de Concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin

Curitiba, 2012

DEDICO

A meus pais, por terem me mostrado a importância do conhecimento na busca do sucesso profissional e pessoal, e ao meu marido, por ser minha fonte de força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique G. Zarbin, pela amizade, oportunidades e por contribuir de forma tão dedicada à minha formação acadêmica, pessoal e social.

Ao curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade concedida.

Aos professores que avaliaram este trabalho, Dr. Angelo da Cunha Pinto (UFRJ), Dr. Jan Bergmann (PUC Chile), Dra. Maria Fátima G. F. da Silva (UFSCar) e Dr. Alfredo R. M. Oliveira (UFPR).

Ao INCT – Semioquímicos na Agricultura, pelo suporte financeiro para a realização do curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Jocelyn G. Millar (UC – Riverside), por me receber tão bem em seu laboratório e me orientar na realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alfredo R. M. Oliveira, por várias vezes aconselhar sobre a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jan Bergmann, que colaborou com um procedimento chave no estudo do feromônio de *Pallantia macunaima*.

Ao Dr. Jeffrey R. Aldrich, pela amizade, os ensinamentos sobre percevejos e a participação fundamental no estudo dos compostos defensivos de *P. macunaima*.

À Emprapa Soja – Londrina, pela colaboração, enviando insetos e disponibilizando suas plantações para futuros testes de campo com *Agroecus griseus*.

Aos colegas do Laboratório de Semioquímicos da UFPR, atuais e antigos, Miryan, Marcy, Bianca, Angela, Ana Cris, Camila M., Priscila, Daiane, Rafael, Emir, Diogo, Douglas, Camila F., Matheus, Liah e Eduarda, pela constante troca de conhecimentos, convivência agradável, e estarem presentes em muitos momentos de alegrias e tristezas.

Ao colega Rafael Soldi, pela colaboração no trabalho do feromônio sexual de *P. macunaima*.

À aluna de iniciação científica, Tatiana B. Santos, que ajudou a realizar parte do trabalho de *A. griseus*.

À Miryan, Marcy, Bianca e Angela, que me apresentaram à Entomologia.

À minha família, que sempre me apoiou e torceu pela minha felicidade e sucesso.

Ao meu marido Flávio, que não me deixa desanimar de correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu professor e amigo, Waldir Perissini Junior, por me apresentar aos “Feromônios de Insetos” e me incentivar a seguir a carreira científica.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO GERAL.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
APRESENTAÇÃO	xxii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Semioquímicos no controle de pragas agrícolas	1
Etapas da pesquisa com feromônios	6
Ecologia química de percevejos.....	12
Semioquímicos identificados das principais espécies-pragas de pentatomídeos do Brasil .	18
OBJETIVOS GERAIS.....	22
CAPÍTULO I - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DEFENSIVOS ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS METATORÁCICA E ABDOMINAIS DORSAIS DOS PERCEVEJOS <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> E <i>Agroecus griseus</i> (Heteroptera: Pentatomidae).....	23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1.1. INTRODUÇÃO	26
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
1.3.1. Insetos	31
1.3.2. Extração do conteúdo das glândulas abdominais dorsais (DAGs)	32
1.3.3. Extração da glândula metatorácica (MTG).....	33
1.3.4. Análises químicas	34
1.3.5. Microderivatização	35

1.3.6. Estatísticas.....	35
1.3.7. Padrões sintéticos.....	35
1.4. RESULTADOS.....	37
1.4.1. Glândulas abdominais dorsais.....	37
1.4.2. Glândula metatorácica	45
1.5. DISCUSSÃO	59
CAPITULO II - IDENTIFICAÇÃO E SÍNTESE DOS FEROMÔNIOS SEXUAIS DAS	
ESPÉCIES <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> E <i>Agroecus griseus</i> (Heteroptera:	
Pentatomidae)	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
2.1. INTRODUÇÃO	66
2.2. Objetivos específicos	69
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.3.1. Insetos	70
2.3.2. Coleta de voláteis.....	70
2.3.3. Análises químicas	72
2.3.4. Microderivatizações.....	73
2.3.5. Bioensaios com olfatômetros de dupla-escolha.....	76
2.3.6. Estatísticas.....	78
2.3.7. Sínteses	78
2.4. RESULTADOS.....	90
2.4.1. <i>Pallantia macunaima</i>	90
2.4.2. <i>Pellaea stictica</i>	111
2.4.3. <i>Agroecus griseus</i>	131

2.5. DISCUSSÃO	137
CONCLUSÃO	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
ESPECTROS SELECIONADOS PARA O CAPÍTULO I	157
Espectro de massas do (<i>E</i>)-2-octenal (c).....	158
Espectro de massas do undecano (d)	158
Espectro de massas do (<i>E</i>)-4-oxo-2-octenal (e)	159
Espectro de massas do dodecano (f)	159
Espectro de massas do (<i>E</i>)-2-decenal (g).....	160
Espectro de massas do (<i>E</i>)-4-oxo-2-decenal (j)	160
Espectro de massas do tetradecanal (k)	161
Espectro de massas do acetato de (<i>E</i>)-2-octenila (o)	161
Espectro de massas do tetradecano (q)	162
Espectro de massas do acetato de (<i>E</i>)-2-decenila (r)	162
Espectro de massas do pentadecano (s)	163
ESPECTROS SELECIONADOS PARA O CAPÍTULO II	164
Síntese do 4,6-dimetil-2-oxepanona (2).....	165
Espectro de massas do composto 2.....	165
Espectro de RMN de ^1H do composto 2	166
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2	166
Síntese do 6-hidroxi-3,5-dimetilhexanoato de metila (3)	167
Espectro de massas do composto 3	167
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexanoato de metila (4).....	168
Espectro de massas do composto 4	168
Espectro de RMN de ^1H do composto 4	169

Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4	169
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexan-1-ol (5).....	170
Espectro de massas do composto 5	170
Espectro de RMN de ^1H do composto 5	171
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5	171
Síntese do 1-bromo-2-metilnonano (8)	172
Espectro de massas do composto 8	172
Síntese do 1-cloro-2,5-dimetiloctano (12)	173
Espectro de RMN de ^1H do composto 12	173
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12	174
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexanal (14).....	175
Espectro de RMN de ^1H do composto 14	175
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 14	176
Síntese do trifluorometonossulfonato de 3-bromo-2-metilpropila (16).....	177
Espectro de RMN de ^1H do composto 16	177
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 16	178
Síntese do 1-bromo-2,7-dimetil-4-octino (18)	179
Espectro de RMN de ^1H do composto 18	179
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 18	180
Síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (20)	181
Espectro de RMN de ^1H do composto 20	181
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 20	182

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos semioquímicos. (Fotos: Carla Fávaro, Ernandes Santos, L. Shyamal)	2
Figura 2. Comportamento de acasalamento da mariposa do bicho-da-seda, <i>Bombyx mori</i> , e estrutura química do bombicól. (Foto: Samuel Woo).....	3
Figura 3. Exemplo de armadilhas usadas para monitoramento (A) e coleta massal (B) de pragas e liberador de feromônio para a técnica de “confusão sexual” (C). (Fotos: Pest Wizard™, RESCUE!®, Eugene E. Nelson)	5
Figura 4. Glândula produtora de feromônio sexual da mariposa <i>Diatraea sacharallis</i> (A) e de feromônio de alarme do percevejo <i>Loxa deducta</i> (B). (Fotos: Carla Fávaro)	7
Figura 5. Sistema de coleta de voláteis de plantas e insetos. (Foto: Carla Fávaro)	8
Figura 6. Comparação dos cromatogramas dos extratos de voláteis de machos e fêmeas da espécie <i>Edessa meditabunda</i> . ¹²	9
Figura 7. Exemplo de perturbação eletrofisiológica da antena do inseto apenas para o composto bioativo do extrato.....	10
Figura 8. Equipamentos utilizados para análises de extratos no Laboratório de Semioquímicos – UFPR: Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP- 2010 Plus e cromatógrafo gasoso Shimadzu GC2010 acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF) DiscovIR-GC (Spectra Analysis). (Fotos: Carla Fávaro)	11
Figura 9. Exemplo de danos provocados por percevejos em tomates. (Fotos: George C. Hamilton)	13
Figura 10. Adultos de (A) <i>Agroecus griseus</i> , (B) <i>Pallantia macunaima</i> e (C) <i>Pellaea stictica</i> . (Fotos: Carla Fávaro)	14

Figura 11. Etograma que descreve o comportamento pré-cópula de <i>Pellaea stictica</i> . ²²	16
Figura 12. Esquema e foto das glândulas abdominais dorsais (A e B) e da glândula metatorácica (C e D). DAG1, DAG2 e DAG 3: três pares de glândulas; GL: glândula lateral, R: reservatório. ^{15, 38} (Fotos: Carla Fávaro).....	27
Figura 13. A) Localização da glândula metatorácica, B) MTG da fêmea e C) MTG extraída de insetos adultos da espécie <i>Pallantia macunaima</i> . (Fotos: Carla Fávaro).....	28
Figura 14. A) Localização das glândulas abdominais dorsais em uma ninfa de 5º instar, B) Glândulas abdominais dorsais (DAGs), C) exúvia de 5º instar de <i>Pallantia macunaima</i> . (Fotos: Carla Fávaro)	28
Figura 15. Exemplo de gaiola de criação de percevejos contendo: A) vagens verdes de feijão <i>Phaseolus vulgaris</i> (L.), B) sementes de soja <i>Glycine max</i> (L.), C) amendoim cru (<i>Arachis hypogaea</i> L.) e D) frutos de ligustro <i>Ligustrum lucidum</i> Ait.	31
Figura 16. Extração em hexano dos compostos químicos presentes nas exúvias. (Fotos: Carla Fávaro)	32
Figura 17. Etapas do processo de extração do conteúdo da glândula metatorácica.	33
Figura 18. Exemplos de cromatogramas obtidos nas análises dos extratos de exúvias de <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> e <i>Agroecus griseus</i>	38
Figura 19. Espectro de massas do composto a	39
Figura 20. Espectro de massas do composto b	40
Figura 21. Espectro de massas do composto i	41
Figura 22. Espectro de massas do composto h	41
Figura 23. Exemplos de cromatogramas dos extratos das MTG de adultos das espécies <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> e <i>Agroecus griseus</i>	46
Figura 24. Espectro de infravermelho do composto l	47
Figura 25. Espectro de massas do composto l	48

Figura 26. Resolução enantiomérica do acetato de 2-metilbutila (j) em coluna capilar β -DEX™ 325.	49
Figura 27. Espectro de infravermelho do composto m	50
Figura 28. Espectro de massas do composto m	51
Figura 29. Espectro de massas do composto n	52
Figura 30. Espectro de massas do composto p	52
Figura 31. Estrutura química dos compostos defensivos presentes nas DAGs de ninfas e na MTG de adultos <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> e <i>Agroecus griseus</i>	53
Figura 32. Percevejos acasalando. (Foto: Carla Fávaro)	66
Figura 33. Exemplos de estruturas químicas dos feromônios sexuais ou de agregação identificados até agora em Pentatomidae. a) <i>Euschistus heros</i> ³⁰⁻³¹ ; b) <i>Tibraca limbativentris</i> ³⁷ ; c) <i>Nezara viridula</i> ³⁴ ; d) <i>Piezodorus hybneri</i> ⁷³ e e) <i>Phthia picta</i> ⁷²	67
Figura 34. Aspecto dos últimos tergitos abdominais e componentes visíveis da genitália de machos e fêmeas, utilizados como critério para sexagem de <i>Pallantia macunaima</i>	70
Figura 35. A) Câmaras de aeração para coleta de voláteis, B) colunas contendo o polímero adsorvente e C) eluição dos compostos retidos no polímero para obtenção do extrato. (Fotos: Carla Fávaro)	71
Figura 36. Processo de fixação de uma antena de <i>Pallantia macunaima</i> em eletrodos de um eletroantenógrafo.	73
Figura 37. Olfatômetro em Y utilizados em bioensaios. C: controle, T: tratamento.	77
Figura 38. Exemplar de adulto da espécie <i>Pallantia macunaima</i>	90
Figura 39. Comparação do cromatogramas obtidos das análises dos voláteis liberados por machos e fêmeas de <i>Pallantia macunaima</i> , mostrando o composto macho-específico.	91

Figura 40. Respostas de machos e fêmeas <i>Pallantia macunaima</i> aos voláteis presentes nos extratos de macho + planta hospedeira vs. voláteis de planta hospedeira <i>Ligustrum lucidum</i> (Oleaceae). Os dados foram analisados com o teste Qui-quadrado ($P=0.003$).....	92
Figura 41. Perturbações de antena de fêmeas para extrato obtido da aeração dos voláteis de machos da espécie <i>Pallantia macunaima</i>	93
Figura 42. Porcentagem de feromônio sexual emitida por machos de <i>Pallantia macunaima</i> na fotofase e na escotofase. Colunas com letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P<0,0001$) ($n = 6$).	93
Figura 43. Espectro de infravermelho do composto macho-específico da espécie <i>Pallantia macunaima</i>	94
Figura 44. Espectro de massas do composto macho-específico produzido por <i>Pallantia macunaima</i>	95
Figura 45. Rearranjo de McLafferty resultando no fragmento m/z 58. ⁵⁴	95
Figura 46. Espectro de massas do produto da hidrogenação da geranil acetona.	96
Figura 47. Espectro de massas e possível estrutura atribuída ao composto macho-específico da espécie <i>Pallantia macunaima</i>	96
Figura 48. Espectro de massas do álcool derivado da redução do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i>	97
Figura 49. Espectro de massas do produto da reação de silição com TMSCl do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i>	98
Figura 50. Coinjeção em CG com coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10-dimetilpentadecan-2-ona.	99
Figura 51. Espectros de massas do composto produzido pelos machos <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10-dimetilpentadecan-2-ona.	99

Figura 52. Espectros de massas do hidrocarboneto e deutereto derivado do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i> , com destaque aos fragmentos m/z 99, m/z 101, m/z 169 e m/z 171.....	101
Figura 53. Comparação entre a intensidade relativa do fragmento m/z 57 nos espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i> (A) e do tridecano (B).	102
Figura 54. Espectros de massas do hidrocarboneto e deutereto derivado do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i> , com destaque aos fragmentos m/z 57, m/z 99, m/z 101, m/z 169, m/z 171, m/z 211 e m/z 213.....	103
Figura 55. Comparação entre os tempos de retenção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona.....	104
Figura 56. Espectros de massas do composto macho-específico produzido por <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona.	105
Figura 57. Espectro de massas resultante da subtração do espectro do deutereto – espectro do hidrocarboneto.	106
Figura 58. Espectro de massas do hidrocarboneto e deutereto derivados do composto macho-específico de <i>Pallantia macunaima</i>	107
Figura 59. Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.....	108
Figura 60. Comparação entre espectros de massas do composto produzido pelos machos <i>Pallantia macunaima</i> e da 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.	108
Figura 61. Resposta da antena de uma fêmea <i>Pallantia macunaima</i> para o 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.	109
Figura 62. Resultados dos testes de dupla escolha feitos em olfatômetro em Y com insetos fêmeas (N = 34) e machos (N = 11) da espécie <i>Pallantia macunaima</i> , testando a atratividade	

do 6,1013-trimetiltetradecan-2-ona vs. hexano (controle). Teste de Qui-quadrato, $P < 0,001$.

..... 110

Figura 63. Exemplar de inseto adulto da espécie *Pellaea stictica*. 111

Figura 64. Comparação dos cromatogramas obtidos da aeração dos voláteis de machos e fêmeas da espécie *Pellaea stictica*. Análise realizada na coluna RTX-WAX. 111

Figura 65. Perturbação de antenas de fêmeas frente ao extrato de aeração dos voláteis de machos da espécie *Pellaea stictica*. 112

Figura 66. Respostas de machos e fêmeas *Pellaea stictica* aos voláteis presentes nos extratos de macho + planta hospedeira vs. voláteis de planta hospedeira (*Ligustrum lucidum* (Oleaceae). Os dados foram analisados com o teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). 113

Figura 67. Porcentagem de emissão do composto presente nos extratos de machos de *Pellaea stictica* na fotofase e na escotofase ($n = 4$). Colunas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Anova + Tukey, $P < 0,01$). 113

Figura 68. Espectro de infravermelho do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica*. 114

Figura 69. Espectro de massas do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica*. 115

Figura 70. Espectro de massas do produto da reação do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica* com TMSCl. 115

Figura 71. Espectro de massas do ácido carboxílico derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica*. 116

Figura 72. Espectro de massas do éster metílico derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica*. 117

Figura 73. Espectros de massas do hidrocarboneto (A) e deutereto (B) derivados do composto macho-específico de *Pellaea stictica*. 118

Figura 74. Espectro de massas e proposta para a estrutura química do feromônio sexual de <i>Pellaea stictica</i>	118
Figura 75. Espectros de massas do composto macho-específico produzido por <i>Pellaea stictica</i> e do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (9).....	122
Figura 76. Comparação entre os tempos de retenção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos de <i>Pellaea stictica</i> e do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (9).....	122
Figura 77. Espectros de massas do hidrocarboneto (A) e do deutereto (B) derivados do composto macho-específico produzido por <i>Pellaea stictica</i>	123
Figura 78. Cromatograma da coinjeção do hidrocarboneto (Hc) derivado do composto produzido pelos machos de <i>Pellaea stictica</i> e do 2,4,8,11-tetrametiltetradecano, em coluna RTX-5.	125
Figura 79. Espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de <i>Pellaea stictica</i> (A) e do 2,4,8,11-tetrametiltetradecano (B).	126
Figura 80. Comparação entre a intensidade relativa do fragmento m/z 57 nos espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de <i>Pellaea stictica</i> (A) e do tridecano (B).	127
Figura 81. Espectros de massas do feromônio de <i>Pellaea stictica</i> e do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (20).	130
Figura 82. Exemplar de adulto da espécie <i>Agroecus griseus</i>	131
Figura 83. Análises cromatográficas dos voláteis produzidos por machos e fêmeas <i>Agroecus griseus</i> , com destaque para o composto produzido exclusivamente pelos machos. Programa de temperatura utilizado: 100°C por 1min, aumentando 10°C / min até 250 e permanecendo a esta temperatura por 10 min.....	132
Figura 84. Resposta de antena de fêmea <i>Agroecus griseus</i> em análises de CG-EAG utilizando extrato dos voláteis de machos.	132

Figura 85. Espectro de infravermelho do composto macho-específico de <i>Agroecus griseus</i> .	133
Figura 86. Espectro de massas do composto macho-específico de <i>Agroecus griseus</i> .	134
Figura 87. Resposta da antena de <i>Agroecus griseus</i> fêmea para o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.	135
Figura 88. Resultados dos testes de dupla escolha feitos em olfatômetro em Y com insetos machos (10 insetos utilizados, 3 respostas) e fêmeas (40 insetos utilizados, 35 respostas) <i>Agroecus griseus</i> , testando a atratividade do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila vs. controle (hexano). Teste de Qui-quadrado, $P < 0,001$.	136

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais compostos defensivos identificados nas misturas feromonais das espécies <i>Dichelops melacanthus</i> (Dm), <i>Euschistus heros</i> (Eh), <i>Nezara viridula</i> (Nv), <i>Piezodorus guildinii</i> (Pg), <i>Tibraca limbativentris</i> (Tl) e <i>Edessa meditabunda</i> (Em). ^{22, 27-29}	19
Tabela 2. Feromônios sexuais dos principais pentatomídeos pragas do Brasil, <i>Edessa meditabunda</i> , <i>Euschistus heros</i> , <i>Nezara viridula</i> , <i>Piezodorus guildinii</i> e <i>Tibraca limbativentris</i> . ^{12, 30-37}	21
Tabela 3. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de <i>Pallantia macunaima</i> , de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3)	42
Tabela 4. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de <i>Pellaea stictica</i> , de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3).	43
Tabela 5. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de <i>Agroecus griseus</i> , de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3)	44

Tabela 6. Tempos de retenção (t_R) e comparação dos índices de Kovats (KI) calculados para os compostos presentes no conteúdo das DAGs de ninfas e MTG de adultos das espécies <i>Pallantia macunaima</i> , <i>Pellaea stictica</i> e <i>Agroecus griseus</i> , com os da ref. 19.	54
Tabela 7. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de <i>Pallantia macunaima</i> . (média \pm desvio padrão, N=5)	56
Tabela 8. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de <i>Pellaea stictica</i> . (média \pm desvio padrão, N=5)	57
Tabela 9. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de <i>Agroecus griseus</i> . (média \pm desvio padrão, N=3)	58

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Etapas para obtenção do esqueleto básico de carbono a partir de uma cetona. ⁷⁹	
.....	100
Esquema 2. Rota sintética do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (9).	119
Esquema 3. Rota sintética do 2,4,8,11-tetrametiltetradecan-1-ol (13).	124
Esquema 4. Rota sintética do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (20).	128

RESUMO GERAL

Os percevejos produzem principalmente dois grupos de voláteis, os compostos defensivos (aleloquímicos) e os feromônios de atratividade (agregação e sexual). Os compostos defensivos são produzidos pelos insetos imaturos nas glândulas abdominais dorsais (DAGs) e os adultos os produzem na glândula metatorácica (MTG). O conteúdo das DAGs e da MTG de *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*, foi analisado e caracterizado. A maioria dos compostos encontrados foi semelhante aos de outras espécies de Pentatomidae, sendo eles hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, oxo-alcenais e ésteres. No entanto, dois compostos presentes na MTG de *A. griseus* são inéditos para esta família. Análises de espectrometria de massas (CG-EM) e espectroscopia de infravermelho (CG-IVTF), juntamente com injeções em CG com padrões sintéticos confirmaram as estruturas químicas destes compostos como acetato de (*S*)-2-metilbutila e acetato de 3-metil-2-butenila. Visando a identificação do feromônio sexual de cada uma destas espécies, os voláteis liberados por insetos adultos, machos e fêmeas, foram coletados por meio de técnicas de aeração. Na comparação dos resultados das análises dos extratos por CG, foi possível observar a presença de um composto macho-específico para cada espécie, que teve sua atividade biológica confirmada apenas para as fêmeas através de bioensaios laboratoriais. Análises de CG-EM e CG-IVTF dos compostos naturais e seus derivados, sugeriram uma cetona com ramificações metílicas na cadeia carbônica como o composto macho-específico de *P. macunaima* e um álcool, também com ramificações metílicas, para *P. stictica*. Após a síntese de três diferentes estruturas propostas para cada composto natural, estas moléculas foram identificadas como 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona e 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol, respectivamente. Bioensaios com a cetona sintética confirmaram a identificação do feromônio sexual de *P. macunaima*. Para *P. stictica*, a atividade biológica do álcool sintético ainda deve ser

verificada. As análises dos espectros de massas e infravermelho do composto macho-específico de *A. griseus* levou à identificação do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, que teve sua função confirmada como feromônio sexual através de bioensaios com fêmeas de *A. griseus*.

Palavras-chave: Pentatomídeos, compostos defensivos, feromônio sexual, CG-EM, CG-IVTF, microderivatizações.

ABSTRACT

Stink bugs produce two groups of volatiles, the defensive compounds (allelochemicals) and sex pheromones. Pentatomid nymphs produce these compounds in the dorsal abdominal glands (DAGs), and adults produce it in the metathoracic scent gland (MTG). The DAGs and MTG contents of *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* and *Agroecus griseus* were studied. The compounds found in these organisms were similar to those of other Pentatomidae species and included aliphatic hydrocarbons, aldehydes, oxo-alkenals and esters. However, two compounds were found in *A. griseus* MTG that have never been described before for this family. Analysis with the mass spectrometry (GC-MS) and infrared spectroscopy (GC-FTIR) along with GC analysis using coinjection with authentic standards confirmed the identities of these compounds as enantiopure (*S*)-2-methylbutyl acetate and 3-methyl-2-butenyl acetate. Aiming the identification of the sex pheromone, the volatiles released by males and females adults of the three species were collected by aeration techniques. The GC analysis showed the presence of a male-specific compound for each species, which promoted biological activity in laboratory bioassays only for females. GC-MS and GC-FTIR analysis of the natural compound and its derivatives, suggested a methyl branched ketone as the *P. macunaima* male-specific compound, and a methyl branched alcohol for *P. stictica*. After the synthesis of three different proposed structures for each natural compound, these molecules were identified as 2,4,8,13-tetramethyltetradecan-1-ol and 6,10,13-trimethyltetradecan-2-one. Bioassays with synthetic ketone confirmed the elucidation of *P. macunaima* sex pheromone. To *P. stictica*, the biological activity still needs to be verified. The mass spectrum and infrared data of *A. griseus* male-specific compound matched with methyl 2,6,10-trimethyltridecanoate, which had its role as sex pheromone confirmed through bioassays with *A. griseus* females.

Keywords: Pentatomid, defensive compounds, sex pheromone, GC-MS, GC-FTIR, microderivatizations.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho está dividido em dois capítulos:

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DEFENSIVOS ENCONTRADOS NAS
GLÂNDULAS METATORÁCICA E ABDOMINAIS DORSAIS DOS PERCEVEJOS
Pallantia macunaima, *Pellaea stictica* E *Agroecus Griseus* (Heteroptera: Pentatomidae)

CAPITULO II

IDENTIFICAÇÃO E SÍNTESE DOS FEROMÔNIOS SEXUAIS DAS ESPÉCIES *Pallantia*
macunaima, *Pellaea stictica* E *Agroecus griseus* (Heteroptera: Pentatomidae)

INTRODUÇÃO GERAL

Semioquímicos no controle de pragas agrícolas

Atualmente há uma crescente preocupação de organizações nacionais e internacionais com o impacto ambiental causado por agrotóxicos empregados no controle de pragas, utilizados em grande escala para o aumento da produtividade agrícola.¹ Esta preocupação tem despertado um grande interesse na comunidade científica sobre o estudo de produtos naturais e de conservação dos habitat, entre eles os semioquímicos envolvidos nas relações planta-inseto e inseto-inseto. Como forma alternativa no controle de pragas, o uso de semioquímicos proporciona uma série de vantagens, entre as quais: simplicidade, economia e um menor impacto ambiental.¹

Semioquímicos são substâncias químicas que intermediam as interações entre os seres vivos, evocando respostas comportamentais ou fisiológicas nos organismos receptores. Semio vem do grego *semeîon* = sinal. Dessa forma, a palavra semioquímicos significa "sinais químicos". Os semioquímicos são classificados com base no tipo de interação, se intraespecífica ou interespecífica, e com base nos custos e benefícios que cada organismo da interação terá.²⁻³

Os aleloquímicos são os semioquímicos que intermediam comportamentos de indivíduos de espécies diferentes, relação denominada de interespecífica. Estas substâncias exercem papel fundamental em todas as comunidades e podem ser divididos em três classes (Figura 1):

- Alomônios: semioquímicos que favorecem o organismo emissor, mas não o receptor;

-Cairomônios: semioquímicos que favorecem o organismo receptor, mas não o emissor;

-Sinomônios: semioquímicos que favorecem o organismo emissor e o receptor.

Os feromônios são os semioquímicos mediadores de comunicação intraespecífica, ou seja, emissor e receptor do sinal químico são da mesma espécie.⁴ Estes sinais químicos são produzidos pelos insetos em glândulas que variam de acordo com a espécie do inseto, sendo as antenas o órgão de reconhecimento destes sinais.⁵ Dentre os feromônios mais investigados nas relações entre insetos, podemos citar os de trilha, alarme, oviposição, agregação e sexual.

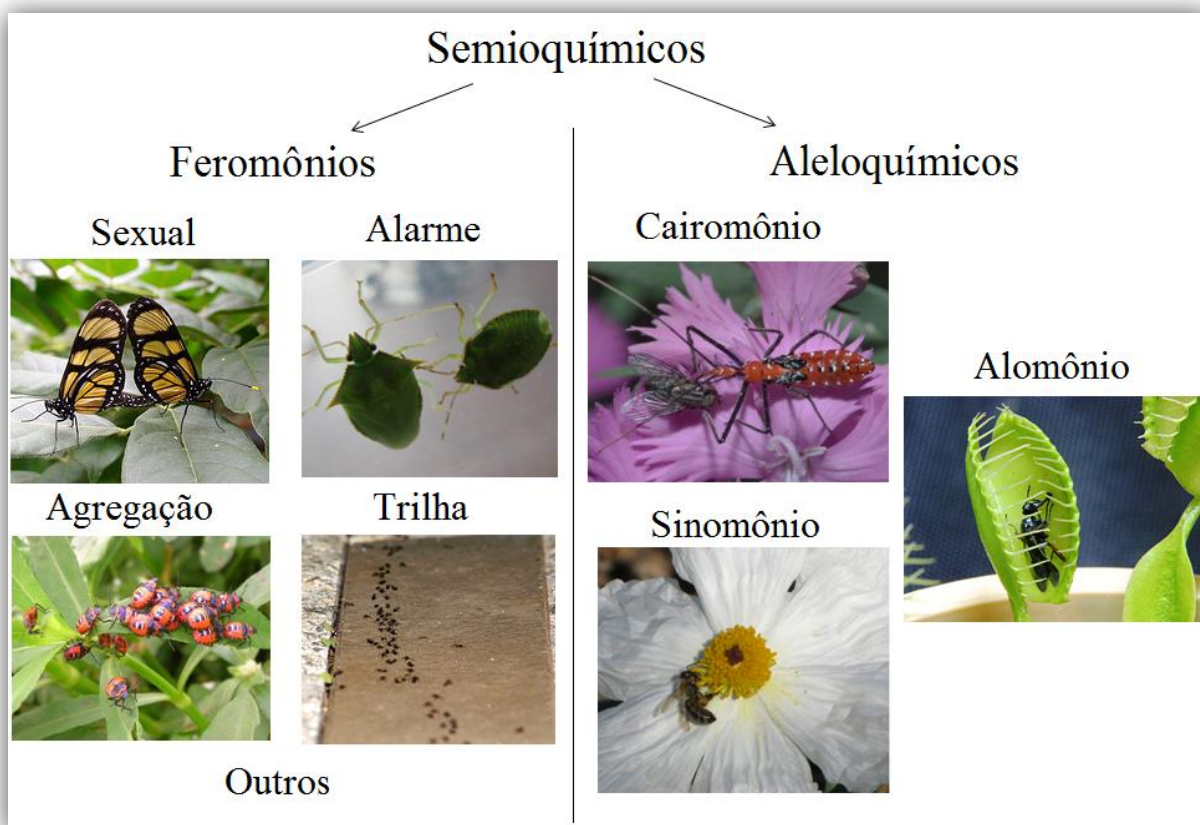


Figura 1. Classificação dos semioquímicos. (Fotos: Carla Fávaro, Ernandes Santos, L. Shyamal)

O primeiro feromônio foi identificado na Alemanha em 1956, após vinte anos de pesquisa pelo químico Adolf Friedrich Johann Butenandt, premiado com o Nobel de Química de 1939. Devido às dificuldades de pesquisa da época, como equipamentos de análises químicas com pouca sensibilidade, os pesquisadores necessitaram de mais de 500 mil insetos para extrair cerca de 12 mg do feromônio da mariposa do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Este feromônio é utilizado pelas mariposas fêmeas para atrair os machos para o acasalamento e foi identificado como sendo o (10E, 12Z)-hexadeca-10,12-dien-1-ol (Figura 2).^{3,6}

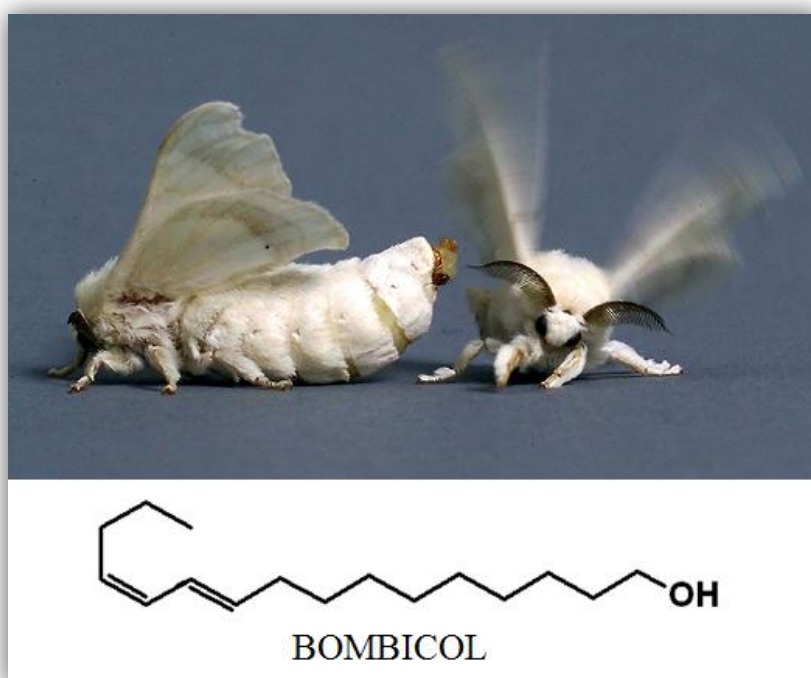


Figura 2. Comportamento de acasalamento da mariposa do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, e estrutura química do bombicol. (Foto: Samuel Woo)

Já no final da década de 1960 foram isolados os primeiros feromônios quirais, como o acetal cíclico exo-brevicomina, feromônio de agregação do besouro do pinheiro *Dendroctonus brevicomis*. Desde então, vários feromônios têm sido isolados e suas estruturas

químicas determinadas, abrangendo desde álcoois e hidrocarbonetos mais simples até compostos polifuncionais mais complexos.⁷

Tradicionalmente, o controle de pragas é feito através do uso de inseticidas. Entretanto, esta prática apresenta uma série de inconvenientes tais como alto custo, riscos de intoxicação, resíduos em alimentos, desenvolvimento de resistência das pragas, surgimento de pragas secundárias e, principalmente, a contaminação ambiental. Uma solução viável para o controle destas pragas seria o uso de produtos químicos que atingissem apenas as espécies alvos, não comprometendo o meio ambiente e a qualidade dos produtos, como fazem os agrotóxicos. Sob tais aspectos, os semioquímicos ocupam lugar de destaque.

Apesar das inúmeras possibilidades de uso dos semioquímicos em estratégias de controle de pragas das culturas agrícolas, os principais métodos estão sempre relacionados ao uso de feromônios sexuais, na forma de armadilhas utilizadas para monitoramento, coleta massal e confusão sexual (Figura 3) .⁴

No monitoramento, os insetos atraídos e retidos nas armadilhas, dia após dia, indicam a quantidade de insetos na lavoura, informando ao agricultor tanto a presença quanto a densidade da praga. Esta técnica visa determinar quando a população do inseto-praga atingiu o nível de dano econômico, preparando o agricultor para intervir no momento certo e com o método mais adequado.⁴



Figura 3. Exemplo de armadilhas usadas para monitoramento (A) e coleta massal (B) de pragas e liberador de feromônio para a técnica de “confusão sexual” (C). (Fotos: Pest Wizard™, RESCUE!®, Eugene E. Nelson)

O modo de ação conhecido como coleta massal consiste em concentrar altas densidades de armadilhas em uma área com a finalidade de capturar o maior número de insetos, visando a eliminação ou diminuição da praga no cultivo.⁴

Além do emprego como atraentes em armadilhas, os feromônios sintéticos também podem ser liberados na atmosfera para a "interrupção dos acasalamentos", como a técnica de confusão sexual. Neste caso, desorientam-se os insetos que não conseguem encontrar os rastros normais de feromônios dos parceiros para o acasalamento. Esta técnica inibe a procriação e evita a ocorrência de altos níveis populacionais da praga.⁴

Dos 447 insetos-pragas do mundo, 103 já foram estudadas no âmbito de semioquímicos, o que representa 23% do total de espécies. Entre as 10 espécies de pragas

mais importantes na agricultura brasileira, nove delas tiveram algum semioquímico identificado. Entre elas estão as pragas da cultura do milho, *Spodoptera frugiperda* e *Elasmopalpus lignosellus*, do algodão, *Spodoptera eridania*, do amendoim armazenado, *Corcyra cephalonica*, do milho armazenado, *Plodia interpunctella*, e a praga polífaga, *Diabrotica speciosa*.⁸

Uma alternativa para o uso de semioquímicos no controle de pragas é a associação ao controle biológico, especialmente com insetos parasitóides e predadores. Semioquímicos produzidos por plantas hospedeiras (alomônios) e insetos fitófagos (caioromônios) são utilizados por insetos entomófagos na busca e seleção de seus hospedeiros. Sendo assim, a utilização destes semioquímicos pode auxiliar a manipulação do comportamento de agentes de controle biológico, aumentando a eficiência do controle de pragas.⁹

Etapas da pesquisa com feromônios

O estudo dos feromônios de insetos é um campo de pesquisa fascinante. A perspectiva de desenvolvimento de métodos ambientalmente benignos do controle de pragas através de sua comunicação química, está levando a um aumento no interesse em atividades de pesquisa nesta área.¹⁰

A metodologia mais utilizada no estudo com feromônios de insetos consiste em quatro principais etapas: extração, isolamento, identificação estrutural e síntese.

Dentre as várias possibilidades de coleta de feromônios, dois métodos são mais utilizados: extração por solvente (extração direta da glândula) e coleta de voláteis.

Na extração por solvente, a glândula produtora do feromônio é removida e seu conteúdo é extraído diretamente no solvente. É uma técnica vantajosa quando se tem conhecimento de qual é a glândula produtora do feromônio (Figura 4). Quando não, é

realizada a extração do corpo do inseto, ou parte dele, obtendo-se extratos com bastante quantidade de impurezas, como hidrocarbonetos e ácidos graxos.³

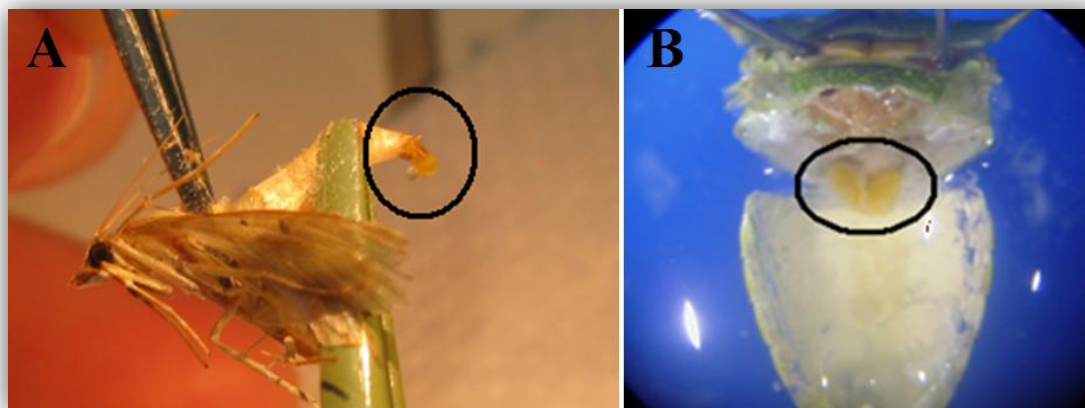


Figura 4. Glândula produtora de feromônio sexual da mariposa *Diatraea sacharallis* (A) e de feromônio de alarme do percevejo *Loxa deducta* (B). (Fotos: Carla Fávaro)

O processo da coleta dos voláteis é realizado principalmente por método de aeração. Nesta técnica, todos os voláteis emitidos pelos insetos, o que inclui os feromônios, são arrastados por um fluxo de ar (filtrado e umidificado) e coletados em um polímero adsorvente (Figura 5). Após o período desejado, estes voláteis são dessorvidos em solvente, como o hexano, para a obtenção dos extratos. Há também a técnica de SPME (sigla em inglês de “microextração em fase sólida”), que dispensa o uso de solventes, mas que não provém extratos para posteriores análises químicas.^{3, 11}

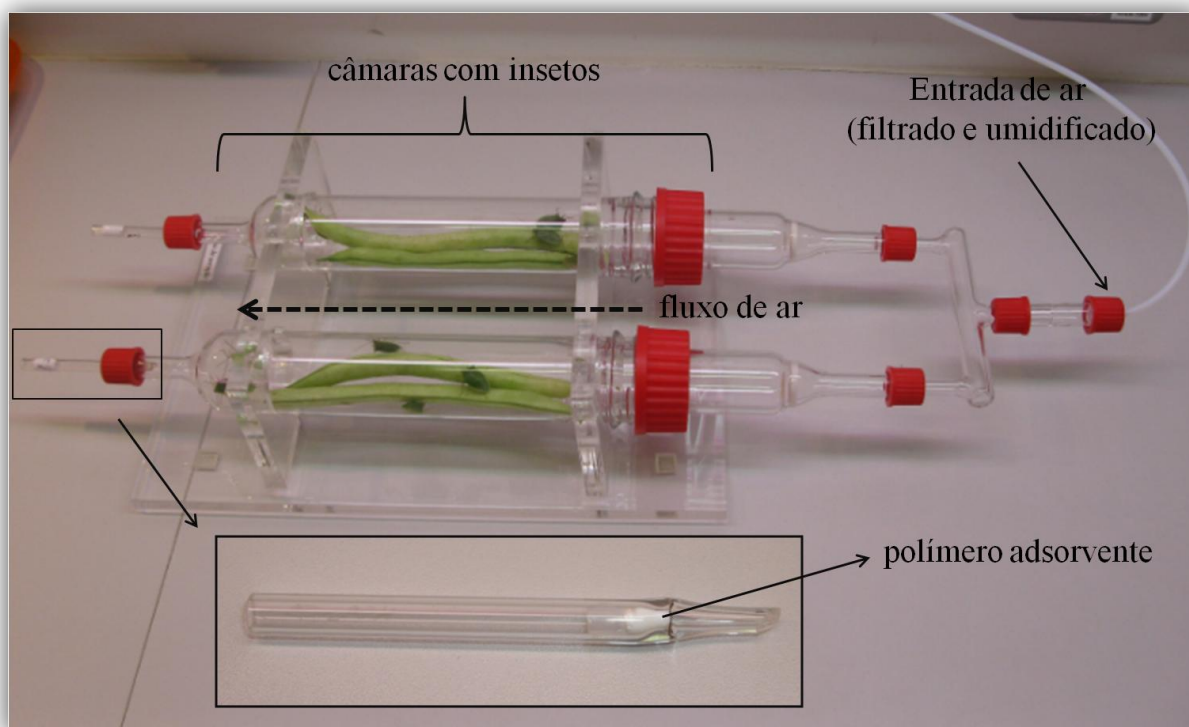


Figura 5. Sistema de coleta de voláteis de plantas e insetos. (Foto: Carla Fávaro)

Logo após a obtenção dos extratos, é realizada a etapa de “isolamento”. Esta etapa nada mais é do que a determinação de qual, ou quais, composto químico dentre todos os presentes no extrato é o feromônio. No estudo com feromônios sexuais ou de agregação, inicialmente é interessante fazer comparação dos cromatogramas obtidos nas análises por cromatografia gasosa (CG) dos extratos de aeração de macho e fêmea pois, normalmente, estes compostos são liberados por apenas um dos sexos. O aparecimento de compostos sexo-específico é um forte indício de obtenção destes feromônios (Figura 6).³

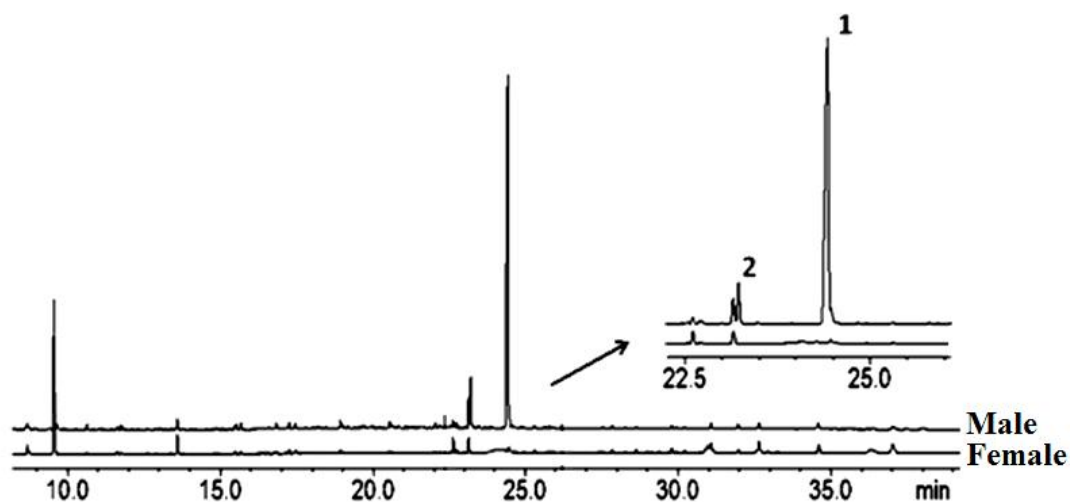


Figura 6. Comparação dos cromatogramas dos extratos de voláteis de machos e fêmeas da espécie *Edessa meditabunda*.¹²

Outra forma de “isolar” quais compostos serão o alvo de estudo dentre os presentes no extrato, é através da análise do extrato pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a um detector eletroantenográfico (CG-EAG). Para esse propósito é utilizado um aparelho chamado eletroantenógrafo, o qual utiliza a antena do inseto como detector, e que é acoplado a um cromatógrafo gasoso com detector FID (sigla em inglês para Detector por Ionização de Chama). Com este aparelho, a detecção do FID e o reconhecimento da antena são simultâneos quando o composto é bioativo (Figura 7).³

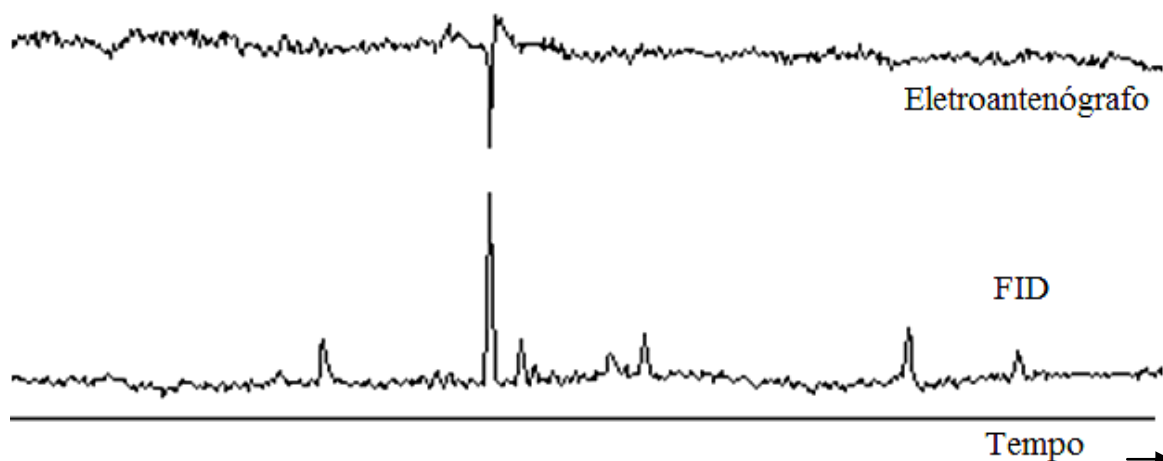


Figura 7. Exemplo de perturbação eletrofisiológica da antena do inseto apenas para o composto bioativo do extrato.

Após determinar quais compostos são de interesse para o estudo, é necessário atribuir as estruturas químicas de cada deles. O principal método utilizado para esse fim é a análise do extrato por cromatografia gasosa acoplada à técnica de espectrometria de massas (CG-EM) e à espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF) (Figura 8).³

Na maioria dos casos, os espectros de massas obtidos dos compostos presentes nos extratos não são suficiente para a elucidação estrutural, principalmente na determinação de posição e isomeria de ligações duplas presentes nas moléculas e determinação de enantiômeros. Com isso, os compostos presentes nos extratos são submetidos à micro-reações para que, então, as análises dos espectros obtidos de seus produtos derivados facilite a determinação de suas estruturas químicas.³



Figura 8. Equipamentos utilizados para análises de extratos no Laboratório de Semioquímicos – UFPR: Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP- 2010 Plus e cromatógrafo gasoso Shimadzu GC2010 acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF) DiscovIR-GC (Spectra Analysis). (Fotos: Carla Fávaro)

Em posse da proposta para a estrutura química do feromônio, é chegada a etapa de síntese. Como os feromônios são, geralmente, produzidos em pequenas quantidades e dificultam as análises cristalográficas e por RMN, a síntese é necessária para confirmar a

estrutura química proposta na identificação estrutural e para estabelecer a configuração absoluta em caso de compostos quirais.¹³

Depois de confirmada a estrutura, o padrão sintético é utilizado para bioensaios onde pode se avaliar a atratividade do feromônio sintético, para que possa ser levado a testes no campo, já na forma de armadilhas.

São diversas as estruturas químicas de feromônios identificadas até agora, que variam desde hidrocarbonetos simples até moléculas altamente complexas, com cadeias cíclicas, ligações duplas ou triplas, heteroátomos, e (vários) centros quirais. Em muitos casos, apenas um isômero, ou uma mistura definida de isômeros, é biologicamente ativo, enquanto que isômeros que não são naturais (ou uma mistura racêmica) podem ser inativos, ou mesmo inibir a resposta para os compostos naturais.¹³ Desta forma, é importante que se estabeleça a configuração absoluta de um feromônio quiral para o desenvolvimento das armadilhas iscadas com feromônios.

Ecologia química de percevejos

Vulgarmente conhecidos como fede-fede, percevejo-fedorento ou percevejo-verde, a família Pentatomidae corresponde a quarta mais numerosa e diversa entre os heterópteros, com ampla distribuição mundial, estando bem representados em todas as principais regiões faunísticas com aproximadamente 760 gêneros e 4.100 espécies. Como na maioria das famílias de Heteroptera, as que ocorrem nas faunas tropicais e subtropicais são as mais extensas.¹⁴

Os percevejos são bem conhecidos pela produção de odores desagradáveis (semioquímicos) que têm dupla finalidade, de defesa contra a predação e feromônio de alarme.¹⁵ Por esse motivo também são conhecidos como “Stink bugs”.

Os pentatomídeos são insetos exclusivamente terrestres e a maioria possui hábitos fitófagos, se alimentando de diversas partes da planta, como sementes, frutos em desenvolvimento ou até flores. Entretanto, a grande maioria se nutre pela extração da seiva das plantas, diretamente de seu sistema vascular, particularmente do floema (Figura 9).¹⁴



Figura 9. Exemplo de danos provocados por percevejos em tomates. (Fotos: George C. Hamilton)

No Brasil, entre os principais insetos-pragas da agricultura estão as espécies de percevejo que atacam a soja, *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii*, *Edessa meditabunda* e *Nezara viridula*; e as que atacam o arroz *Oebalus poecilus*, *O. ypsilongriseus* e *Tibraca limbativentris*.^{4, 14}

Além das espécies consideradas pragas, existem outras espécies de percevejos presentes em menor quantidade nas culturas e que não causam danos econômicos. Porém estas espécies têm potencial para se tornarem pragas, como foi o caso do *E. heros*, que na década de 70 era considerado praga secundária da soja e atualmente é a espécie mais abundante.¹⁶ Três exemplos destas espécies são *Agroecus griseus* Dallas, *Pallantia macunaima* Grazia e *Pellaea stictica* (Dallas) (Figura 10).



Figura 10. Adultos de (A) *Agroecus griseus*, (B) *Pallantia macunaima* e (C) *Pellaea stictica*.
(Fotos: Carla Fávaro)

A. griseus é uma espécie que pode ser encontrada nas plantações de milho no Brasil, se alimentando principalmente da base das plantas e afetando a formação do tecido na fase de crescimento.¹⁷ Além de *A. griseus*, que também ocorre em alguns países da América Central, há mais cinco espécies descritas do gênero *Agroecus* (*A. brevicornis*, *A. lizerianus*, *A. scabricornis*, *A. ecuadoriensis* e *A. reticultus*) que foram relatadas em vários países da América do Sul.¹⁸

A espécie *P. macunaima* foi identificada primeiramente no Brasil¹⁹, sendo descrita no Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, além do Paraguai.¹⁹⁻²⁰ Esta espécie já foi encontrada em plantas de ligustro (*Ligustrum lucidum* Ait.), porém ainda não existem referências descritas sobre plantas hospedeiras.²¹ As referências disponíveis sobre este inseto descrevem aspectos biológicos, morfométricos e morfológicos de ovos e ninfas (insetos imaturos). Rodrigues²² apresentou um estudo sobre a duração das formas imaturas de *P. macunaima*, revelando que esta espécie necessita em torno de 43 dias para evoluir desde a sua fase embrionária (ovos) até a fase adulta, passando por cinco ínstares de fase ninfal.

P. stictica, originalmente descrita no gênero *Rhaphigaster*, é um percevejo Neotropical encontrado na Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Panamá e Estados Unidos.²³ Em Curitiba são facilmente encontrados em plantas de ligustro. Os únicos estudos relatados para esta espécie são relativos à biologia de adultos e ninfas, e foi realizado por Rodrigues.²² Em sua pesquisa, Rodrigues descreve o período de desenvolvimento médio de ovo a adulto de *P. stictica*, que foi de aproximadamente 36,9 dias, pouco menor que *P. macunaima*. Foi descrita também, o comportamento de acasalamento desta espécie e a coloração das ninfas, que no abdômen é predominantemente vermelha com detalhes negros na região abdominal.

O comportamento reprodutivo dos pentatomídeos é desencadeado por três diferentes tipos de comunicação: semioquímicos, sinais vibracionais e comportamentais. Primeiramente, os machos liberam feromônios, sexuais ou de agregação, para atrair as fêmeas para o acasalamento. Quando os insetos estão próximos, na mesma planta, por exemplo, inicia-se a comunicação vibracional através da movimentação de asas, abdômen e antena, para que os parceiros se encontrem. Quando se encontram, macho e fêmea iniciam uma sequência comportamental que precede a cópula.²²

O comportamento precedente à cópula também é parecido entre as varias espécies de percevejos. Rodrigues²² verificou que o comportamento de *P. stictica* é baseado em oito etapas (Figura 11): 1) o macho libera voláteis para atrair a fêmea; 2) a fêmea bate asas vigorosamente em resposta aos voláteis; 3) aproximação entre macho e fêmea, mas mantendo certa distância; 4) início da comunicação vibracional; 5) macho e fêmea se tocam com as antenas; 6) o macho começa a dar “cabeçadas” na fêmea e, se ela estiver receptiva, eleva o abdômen; 7) o macho alinha a extremidade do abdômen ao da fêmea, expõe e gira 180° o edeago (genitália) e o introduz na genitália da fêmea; 8) durante o acasalamento, o macho fica posicionado abaixo da fêmea.

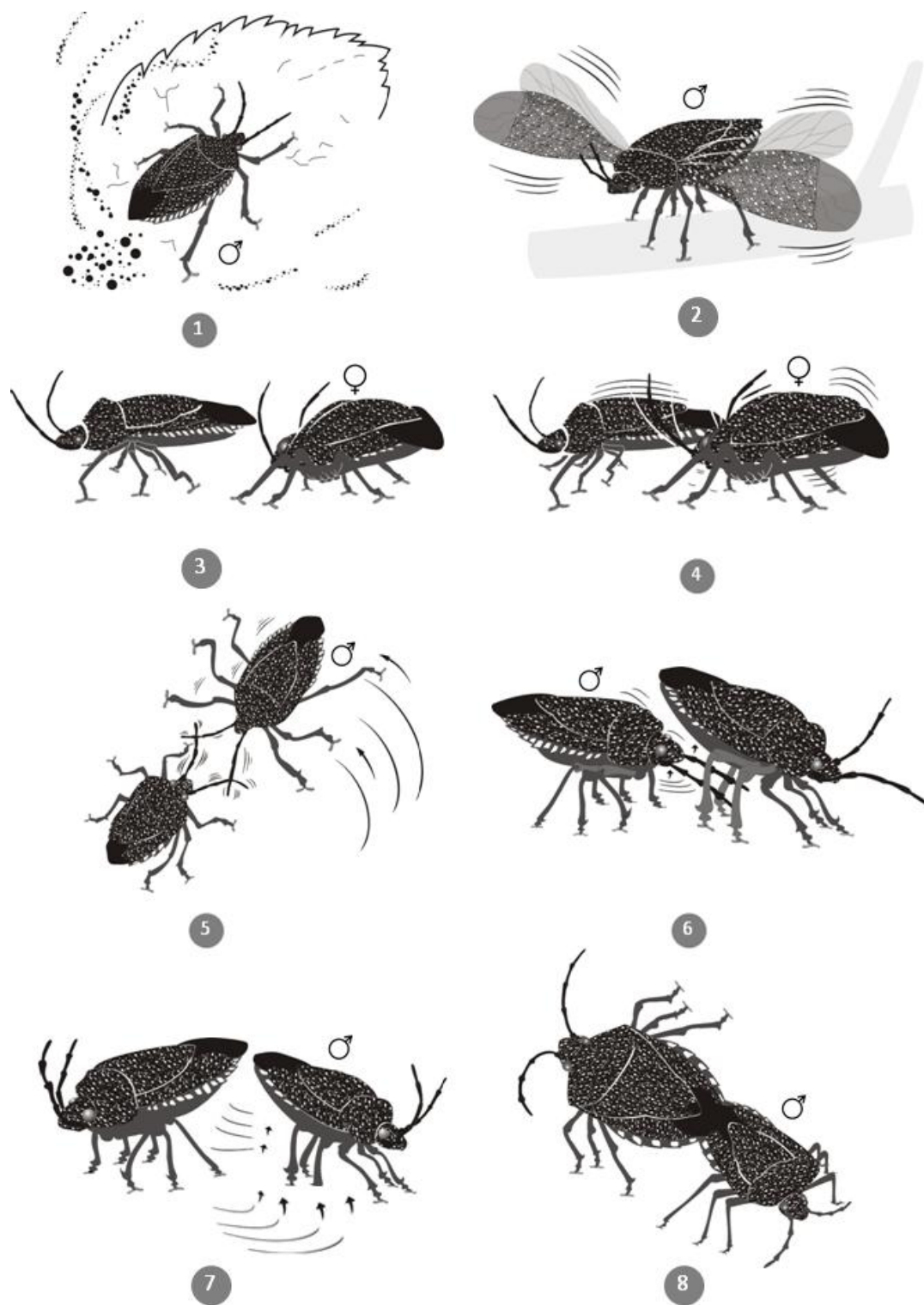


Figura 11. Etograma que descreve o comportamento pré-cópula de *Pellaea stictica*.²²

Apesar de bastante comuns no Brasil e em outros países da América do Sul, este é o primeiro trabalho sobre os semioquímicos dos gêneros *Agroecus*, *Pallantia* e *Pellaea*.^{18, 21}

Atualmente, o principal método de monitoramento dos percevejos nas plantações é através de inspeção visual em busca de danos. Esta técnica requer trabalho intensivo e rotineiro para gerar avaliações realistas da população. Por outro lado, percevejos adultos voam e podem rapidamente migrar de uma cultura para outra vizinha, ou para a vegetação nativa ao redor. Consequentemente, a amostragem frequente é necessária para detectar a imigração destes insetos para as plantações, a fim de aplicar as medidas de controle antes do dano significativo. Desta forma, as armadilhas iscadas com feromônios sexuais ou de agregação podem minimizar estes problemas.²⁴

Os percevejos produzem principalmente dois grupos de voláteis, os compostos defensivos (aleloquímicos) e os feromônios de atratividade (agregação e sexual). O estudo dos aleloquímicos de pentatomídeos tem crescido consideravelmente, em parte por também atuarem como feromônios de defesa e porque são misturas produzidas em grande quantidade, sendo assim de fácil análise e identificação. Já os feromônios de atratividade são menos estudados, uma vez que estes insetos produzem grandes quantidades de voláteis de defesa em resposta à perturbação. Com isso, pode ser difícil obter extratos dos seus voláteis que não estejam contaminados com estas secreções defensivas, o que pode mascarar os componentes do feromônio. Por isso é de grande interesse ter o conhecimento das estruturas químicas dos componentes de defesa da espécie de percevejo em estudo para, então, se iniciar os trabalhos com seu feromônio sexual ou de agregação.¹¹


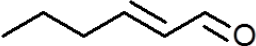
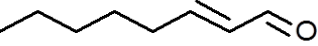
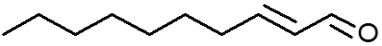
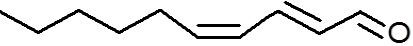








Semioquímicos identificados das principais espécies-pragas de pentatomídeos do Brasil

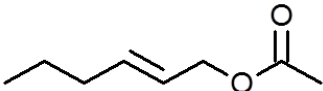
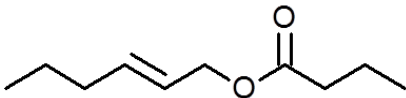
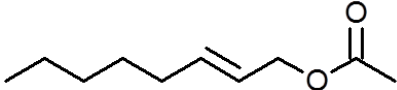
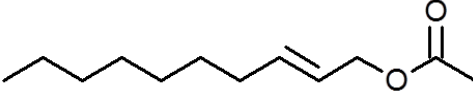
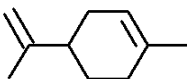
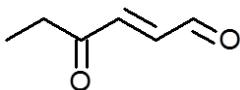
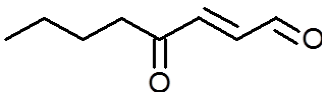
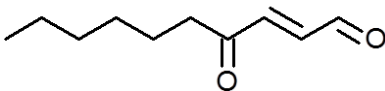
O primeiro estudo com semioquímicos de pentatomídeos foi a identificação dos compostos defensivos da espécie *Oebalus pugnax*, em 1960.²⁵ Das espécies de percevejos pragas do Brasil, a primeira a ter seu feromônio como alvo de estudo foi *N. viridula*, em 1978.²⁶ Desde então, várias espécies de percevejos que são pragas agrícolas no Brasil vem sendo alvo de estudo, no intuito de se desenvolver medidas de controle que não agredem o meio ambiente.

No Brasil, seis das principais espécies-pragas da família Pentatomidae tiveram algum tipo de semioquímico identificado. São eles *Dichelops melacanthus*, *E. heros*, *N. viridula*, *P. guildinii*, *T. limbativentris* e *E. meditabunda*.⁴

Dentre eles, os compostos defensivos foram os mais investigados. A maioria dos compostos identificados se repetem entre as espécies. Eles fazem parte, principalmente, de grupos de hidrocarbonetos, aldeídos, oxo-aldeídos e ésteres. As principais diferenças entre as misturas defensivas, que as tornam espécie-específica, são as proporções em que estes compostos estão presentes.¹¹ Na Tabela 1 estão relacionados os principais compostos defensivos identificados nas misturas feromonais das espécies de percevejos pragas descritas acima.

Tabela 1. Principais compostos defensivos identificados nas misturas feromonais das espécies *Dichelops melacanthus* (Dm), *Euschistus heros* (Eh), *Nezara viridula* (Nv), *Piezodorus guildinii* (Pg), *Tibraca limbativentris* (Tl) e *Edessa meditabunda* (Em).^{22, 27-29}

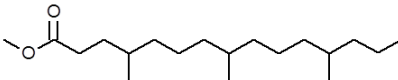
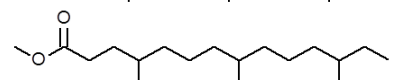
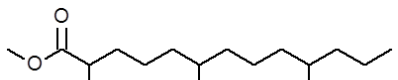
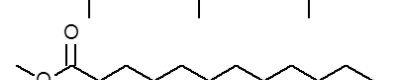
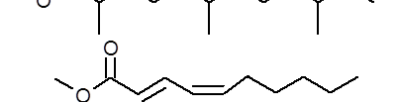
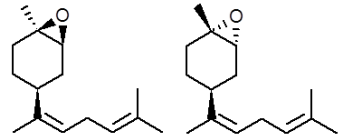
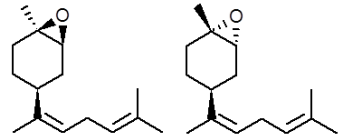
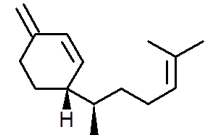
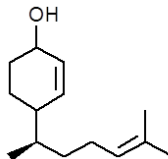
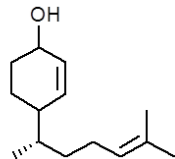
Composto	Estrutura	Espécies
Aldeídos		
Hexanal		Nv, Pg
(E)-2-Hexenal		Dm, Eh, Em, Nv
(E)-2-Octenal		Dm, Eh, Em, Nv, Pg, Tl,
(E)-2-Decenal		Eh, Nv
(E,Z)-2,4-Decadienal		Eh
Tetradecanal		Eh, Pg
Hidrocarbonetos		
Decano		Dm
Undecano		Dm, Em
Dodecano		Dm
Tridecano		Dm, Em
1-Trideceno		Dm
Tetradecano		Dm
Pentadecano		Dm

Ésteres		
Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila		Dm, Eh, Nv
Butirato de (<i>E</i>)-2-hexenila		Eh, Nv
Acetato de (<i>E</i>)-2-octenila		Dm, Eh
Acetato de (<i>E</i>)-2-decenila		Eh, Nv
Terpenos		
Limoneno		Eh, Tl
Oxo-aldeídos		
(<i>E</i>)-4-oxo-2-hexenal		Dm, Em, Eh, Nv
(<i>E</i>)-4-oxo-2-octenal		Dm, Nv
(<i>E</i>)-4-oxo-2-decenal		Eh, Nv

Dos feromônios sexuais identificados até agora em Pentatomidae, não houve um padrão estrutural dos compostos de acordo com famílias ou subfamílias como ocorre, por exemplo, em Lepidoptera. Os lepidópteros produzem principalmente dois grupos de compostos, álcoois e seus derivados (acetatos e aldeídos) de cadeia linear e longa (C10-C18); e hidrocarbonetos de cadeia longa (C17-C23), linear e poli-insaturados, e seus epóxi-derivados. Entre os compostos sexuais identificados para percevejos, é possível encontrar

alcoóis, aldeídos, hidrocarbonetos, terpenos e epóxidos (entre outros), nas mais diversas estruturas químicas.²⁷ Na Tabela 2, estão relacionados os feromônios sexuais identificados dos principais pentatomídeos pragas do Brasil.

Tabela 2. Feromônios sexuais dos principais pentatomídeos pragas do Brasil, *Edessa meditabunda*, *Euschistus heros*, *Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Tibraca limbativentris*.^{12, 30-37}

Espécie	Compostos	Estruturas
<i>E. meditabunda</i>	4,8,12-trimetilpentadecanoato de metila	
	4,8,12-trimetiltetradecanoato de metila	
<i>E. heros</i>	2,6,10-trimetiltridecanoato de metila	
	2,6,10-trimetildodecanoato de metila	
	(E,Z)-2,4-decadienoato de metila	
<i>N. viridula</i>	<i>trans</i> -(Z)-epóxi-bisabolenos	
	<i>cis</i> -(Z)-epóxi-bisabolenos	
<i>P. guildinii</i>	(7R)-β-sesquifelandreno	
<i>T. limbativentris</i>	(1R)-Zingiberenol,	
	(1S)-Zingiberenol	

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho buscou identificar, sintetizar e caracterizar os compostos defensivos presentes no conteúdo das glândulas abdominais dorsais (DAGs) em ninfas e da glândula metatorácica (MTG) em adultos, bem como, os feromônios sexuais produzidos pelos percevejos *Agroecus griseus*, *Pallantia macunaima* e *Pellaea stictica*.

**CAPÍTULO I - IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DEFENSIVOS
ENCONTRADOS NAS GLÂNDULAS METATORÁCICA E ABDOMINAIS
DORSAIS DOS PERCEVEJOS *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* E *Agroecus
griseus* (Heteroptera: Pentatomidae)**

RESUMO

Os pentatomídeos produzem compostos defensivos que têm dupla finalidade, de defesa contra a predação e feromônio de alarme. As ninfas de pentatomídeos produzem seus compostos defensivos nas glândulas abdominais dorsais (DAGs) e nos adultos, estes compostos defensivos são produzidos na glândula metatorácica (MTG). O conteúdo das DAGs e da MTG de *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*, foi caracterizado. A maioria dos compostos encontrados foi semelhante aos de outras espécies de Pentatomidae, sendo eles hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, oxo-alcenais e ésteres. No entanto, dois compostos presentes na MTG de *A. griseus* nunca foram descritos anteriormente para esta família. Análises de espectrometria de massas (CG-EM) e espectroscopia de infravermelho (CG-IVTF), juntamente coinjeções em CG com padrões sintéticos confirmaram as estruturas químicas destes compostos como acetato de (*S*)-2-metilbutila e acetato de 3-metil-2-butenila. Os cinco ínstaros da fase ninfal apresentaram proporções significativamente diferentes destes compostos na mistura feromonal, principalmente entre o primeiro instar e os demais. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na proporção dos compostos presentes na MTG entre adultos machos e fêmeas. Foi realizado um estudo com insetos adultos de diferentes idades das espécies *P. macunaima* e *P. stictica* (10, 20 e 30 dias) onde foram verificadas variações nas proporções de alguns compostos presentes no conteúdo da MTG, conforme o aumento da idade adulta.

ABSTRACT

Stink bugs produce defensive compounds that serves as both an alarm pheromone and as an allomone for defense against predators. Pentatomid nymphs produce these compounds in the dorsal abdominal glands (DAGs), and in adults, allomones are produced in the metathoracic scent gland (MTG). The DAGs and MTG contents of the *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* and *Agroecus griseus* were characterized. The compounds found in these organisms were similar to those of other Pentatomidae species and included aliphatic hydrocarbons, aldehydes, oxo-alkenals and esters. However, two compounds were found in the *A. griseus* MTG that have never been described before for this family. Analysis with the mass spectrometry and infrared spectroscopy along with GC analysis using coinjection with authentic standards confirmed the identities of these compounds as enantiopure (*S*)-2-methylbutyl acetate and 3-methyl-2-butenyl acetate. The five nymphal instars showed significantly different ratios of the components, mainly between those of the first and later instars. No significant differences were detected in the MTG contents between sexes. A study was conducted with *P. macunaima* and *P. stictica* adults of differing ages (10, 20 and 30 days post-emergence) and was observed significant differences in proportions of some MTG compounds in the comparisons between the different age groups.

1.1. INTRODUÇÃO

Os pentatomídeos são comumente conhecidos como “maria-fedida”, “percevejo-fedorento” ou “fede-fede”. Estas denominações se dão porque, em resposta à perturbação ou agressão, insetos imaturos e adultos desta família produzem secreções defensivas irritantes e com odor desagradável que têm dupla finalidade, de defesa contra a predação e feromônio de alarme.¹⁵

Estes odores defensivos são produzidos em dois diferentes tipos de glândulas dependendo do estágio de vida destes insetos. As ninfas (fase precedente à adulta, no qual o inseto possui forma análoga ao adulto, porém com menor tamanho e sem asas), produzem estas secreções nas chamadas glândulas abdominais dorsais (DAGs). Enquanto nos adultos, são produzidos em uma glândula grande, bem definida e de cor laranja, localizada na região metatorácica do inseto, chamada glândula metatorácica (MTG, Figura 12).¹⁵

As DAGs são constituídas de três pares de glândulas (DAG1, DAG2 e DAG3) onde só dois pares possuem reservatórios (Figura 12A e B). A DAG1 muitas vezes permanece ativa nos adultos, enquanto as DAG2 e DAG3 degeneram durante a ecdise (troca do exoesqueleto) para a fase adulta.³⁸

A MTG possui um par de glândulas laterais (GL), que produz a maioria dos componentes da mistura feromonal, e um reservatório (R) que serve para armazenar os compostos produzidos pelas glândulas laterais (Figura 12C e D).¹⁵

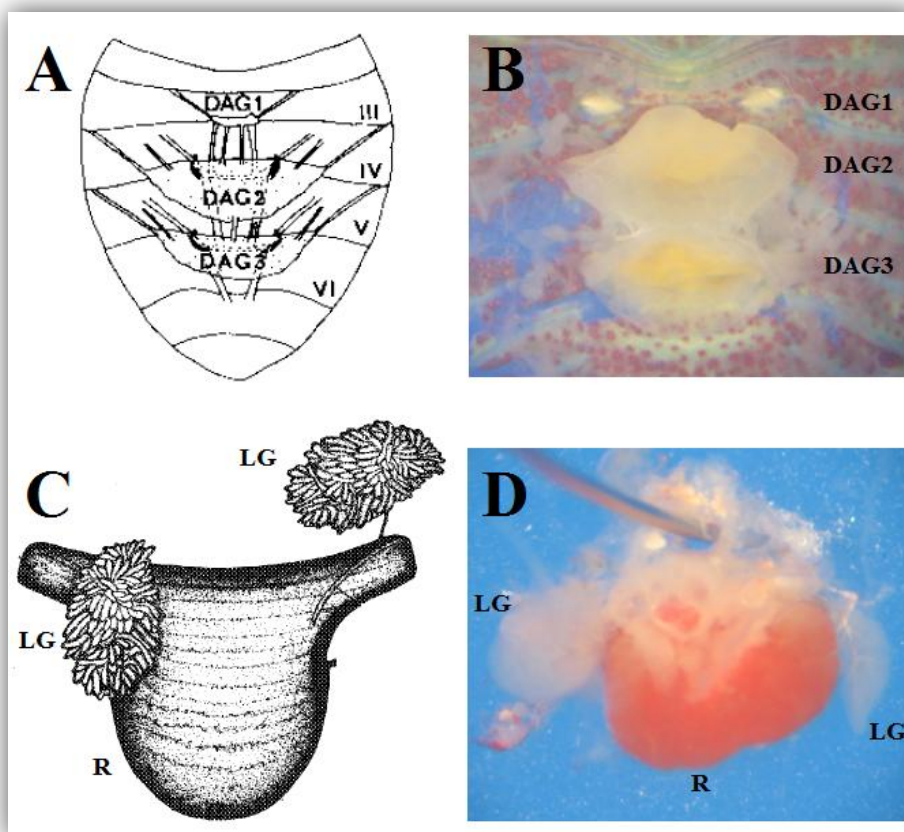


Figura 12. Esquema e foto das glândulas abdominais dorsais (A e B) e da glândula metatorácica (C e D). DAG1, DAG2 e DAG 3: três pares de glândulas; GL: glândula lateral, R: reservatório.^{15, 38} (Fotos: Carla Fávaro)

O principal método de extração dos componentes químicos presentes na MTG é a extração direta do conteúdo da glândula (Figura 13). Para a extração dos componentes das DAGs, são feitos extratos das exúvias (exoesqueletos) liberadas no processo de troca de instar (estágios do período ninfal que permite ao inseto o crescimento corporal, ecdise). Isto porque as ninfas de pentatomídeos transferem o conteúdo das DAGs para suas exúvias e é possível obtê-los se forem extraídos em um período menor que 24 horas após a muda (Figura 14).²⁹

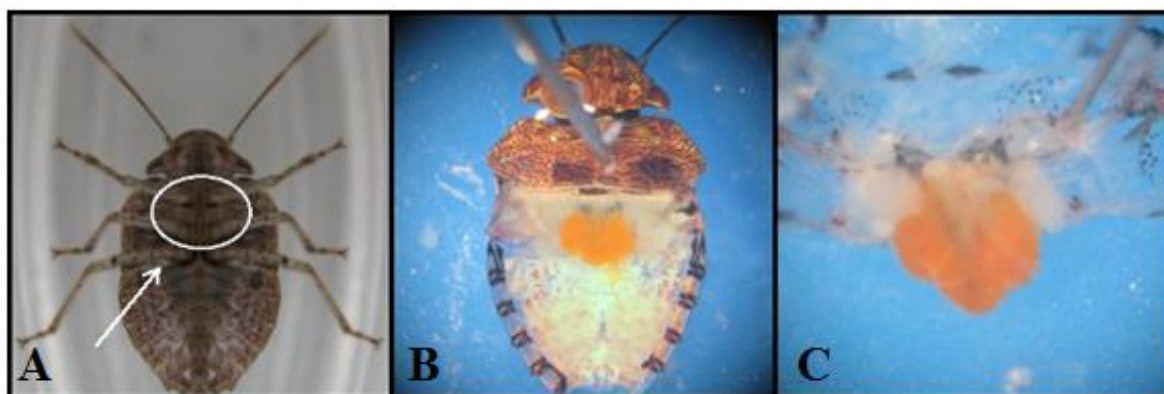


Figura 13. A) Localização da glândula metatorácica, B) MTG da fêmea e C) MTG extraída de insetos adultos da espécie *Pallantia macunaima*. (Fotos: Carla Fávaro)

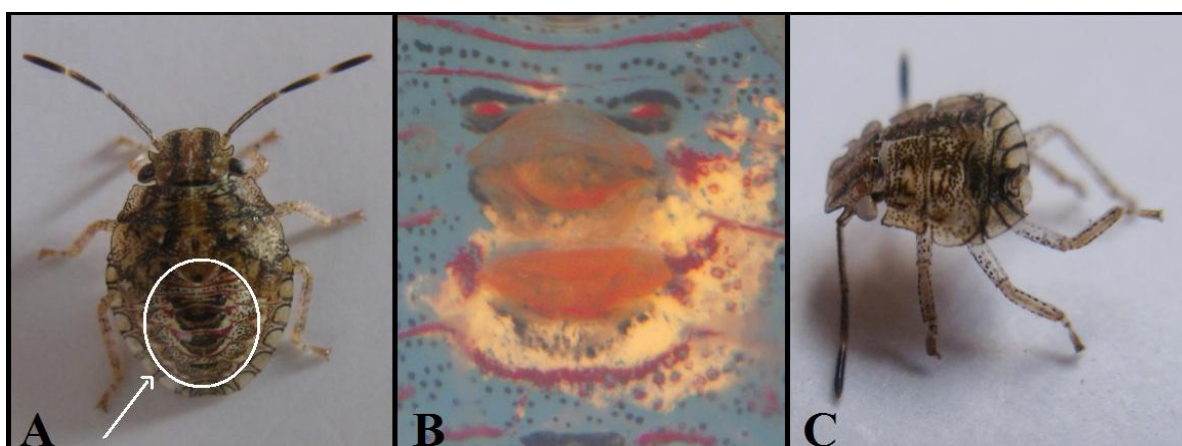


Figura 14. A) Localização das glândulas abdominais dorsais em uma ninfa de 5º instar, B) Glândulas abdominais dorsais (DAGs), C) exúvia de 5º ínstar de *Pallantia macunaima*. (Fotos: Carla Fávaro)

Em pentatomídeos, como em outras famílias, a especificidade da mistura feromonal é devida principalmente à composição quantitativa da mistura do que à presença de compostos

específicos.³⁸ Assim, espécies diferentes podem ter exatamente os mesmos compostos na mistura feromonal, porém esses compostos estão presentes em proporções diferentes.

Estudos anteriores sobre a química defensiva em pentatomídeos mostraram que estas secreções são constituídas principalmente de aldeídos α,β -insaturados (predominantemente o isômero *E*), hidrocarbonetos alifáticos saturados e insaturados; oxo-alcenais (C_6 , C_8 e C_{10}) e ésteres.²⁷

Na literatura, são descritas diferenças qualitativas e quantitativas na composição da mistura defensiva entre ninfas de diferentes instares,^{29, 39} entre ninfas e adultos⁴⁰ e entre adultos machos e fêmeas.⁴¹ Por exemplo, os 4-oxo-alcenais foram encontrados em quantidades mais elevadas nas secreções das ninfas de pentatomídeos do que na MTG de insetos adultos.¹⁵ Estes compostos são responsáveis pela diferenciação da mistura feromonal de ninfas e adultos de pentatomídeos neotropicais.⁴¹

Entretanto, estudos relacionando a composição da mistura feromonal defensiva com o aumento da idade do inseto adulto foram realizados apenas para o inseto *Leptoglossus phyllopus* (Heteroptera: Coreidae).⁴²

Os compostos defensivos presentes nas secreções exócrinas de heterópteros têm papéis importantes nas interações intraespecíficas,⁴³⁻⁴⁴ mas também podem atuar nas interações interespecíficas, em particular com predadores e parasitóides.⁴⁵ Embora estes compostos tenham a finalidade de defesa, há evidências de que eles podem também servir como cairomônios para determinados inimigos naturais. Por exemplo, o parasitóide *Telenomus podisi* usa o (*E*)-2-hexenal para encontrar seu hospedeiro favorito, *Euschistus heros*.²⁷

Assim, o conhecimento quantitativo das semelhanças e diferenças da química defensiva entre espécies também é importante na elaboração de estratégias de controle utilizando inimigos naturais.⁴¹

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Extrair, identificar e comparar todos os compostos encontrados nas glândulas abdominais dorsais (DAGs) das ninfas, dos cinco ínstaes, das espécies *Agroecus griseus*, *Pallantia macunaima* e *Pellaea stictica*;
- 2) Extrair, identificar e comparar os compostos encontrados nas glândula metatorácica (MTG) dos adultos destas espécies;
- 3) Sintetizar os compostos identificados que não apresentarem padrões sintéticos.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Insetos

Exemplares de ninfas e adultos de *A. griseus*, *P. macunaima* e *P. stictica* foram coletados nos campos da Embrapa Soja de Londrina, Paraná, Brasil. Os adultos foram sexados e separados das ninfas, e os insetos foram colocados em gaiolas plásticas (35x20x20 cm) mantidas em câmaras BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 14 horas. Para a alimentação foram utilizados vagens verdes de feijão *Phaseolus vulgaris* (L.), sementes de soja *Glycine max* (L.), amendoim cru (*Arachis hypogaea* L.) e frutos de ligustro *Ligustrum lucidum* Ait. (Figura 15).¹⁶

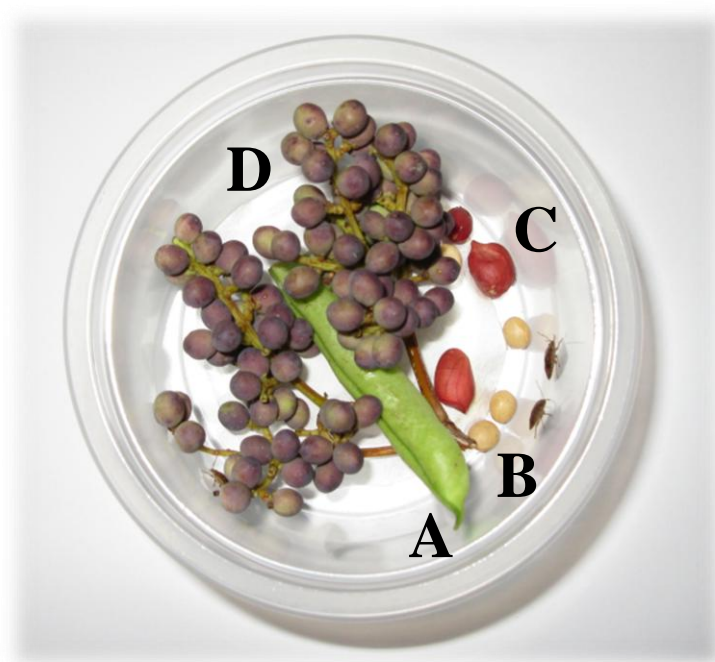


Figura 15. Exemplo de gaiola de criação de percevejos contendo: A) vagens verdes de feijão *Phaseolus vulgaris* (L.), B) sementes de soja *Glycine max* (L.), C) amendoim cru (*Arachis hypogaea* L.) e D) frutos de ligustro *Ligustrum lucidum* Ait.

1.3.2. Extração do conteúdo das glândulas abdominais dorsais (DAGs)

O desenvolvimento das ninfas e liberação das exúvias foi acompanhado diariamente desde a eclosão dos ovos até os insetos se tornarem adultos.

As exúvias foram mantidas em hexano (grau HPLC bidestilado) durante o período de 24 h sendo, logo após, retiradas e os extratos acondicionados em freezer para análises posteriores (Figura 16).^{29, 46}

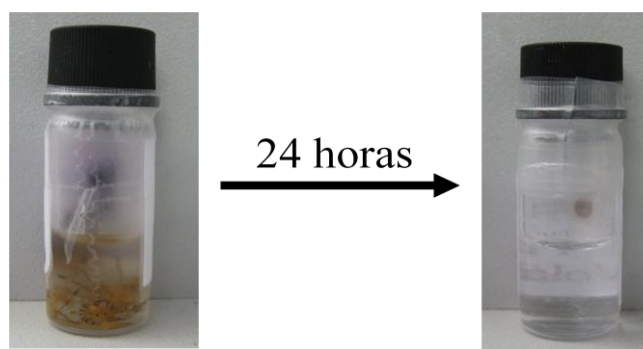


Figura 16. Extração em hexano dos compostos químicos presentes nas exúvias. (Fotos: Carla Fávoro)

Os extratos foram feitos respeitando o número de:

- a) 15 exúvias de primeiro instar, 10 exúvias de segundo e terceiro instar, 5 exúvias de quarto instar e 2 exúvias de quinto instar em 1 mL de hexano para a espécie *A. griseus*;
- b) 10 exúvias de primeiro instar, 8 exúvias de segundo instar, 6 exúvias de terceiro instar, 5 exúvias de quarto instar e 3 exúvias de quinto instar em 1 mL de hexano para a *P. macunaima*;
- c) 10 exúvias de primeiro instar, 8 exúvias de segundo instar, 6 exúvias de terceiro instar, 4 exúvias de quarto instar e 2 exúvias de quinto instar em 1 mL de hexano para *P. stictica*.

1.3.3. Extração da glândula metatorácica (MTG)

Um adulto foi depositado com a parte dorsal voltada para cima em placa de Petri. O processo de dissecação consistiu em cortar as arestas abdominais dorsal da cutícula do inseto até a região metatorácica. A cutícula foi puxada para trás e as vísceras removidas. A glândula foi retirada e imersa em 200 μ L de hexano grau HPLC bidestilado (Figura 17). Após 24 h a glândula foi retirada e o extrato armazenado a -20°C .⁴⁶

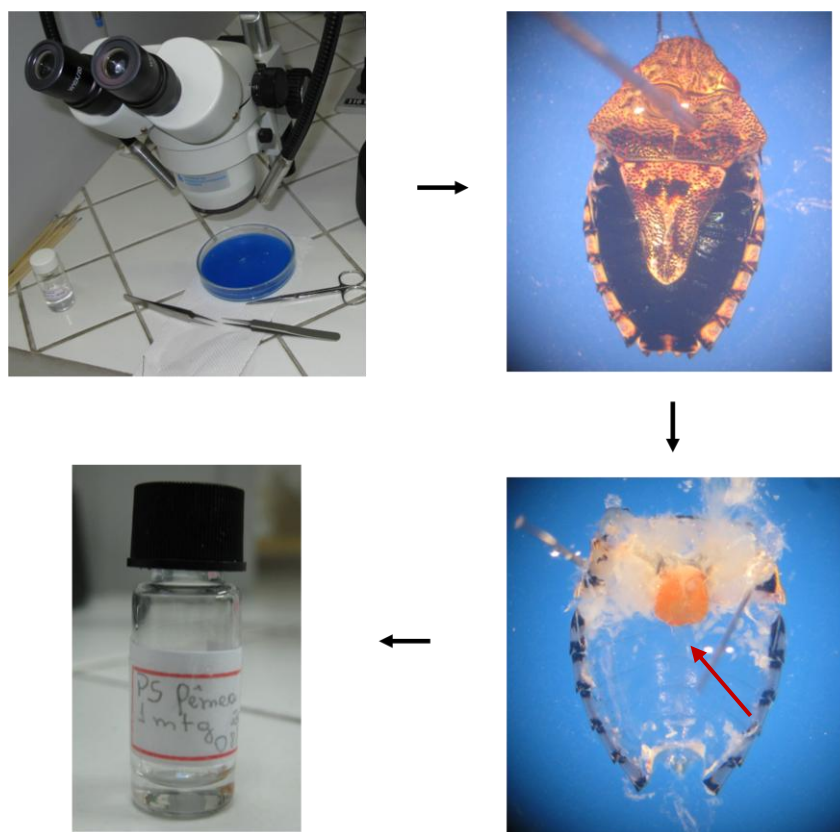


Figura 17. Etapas do processo de extração do conteúdo da glândula metatorácica.

Foram feitos 3 extratos de MTG de insetos com aproximadamente 30 dias de idade adulta da espécie *A. griseus*. Para as espécies *P. macunaima* e *P. stictica* foram feitos extratos de glândulas de insetos com 10, 20 e 30 dias de idade adulta.

1.3.4. Análises químicas

Os extratos foram analisados (1 µL de extrato) pelo cromatógrafo a gás (CG), modelo Shimadzu QP-2010, equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm de filme) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA). O CG foi operado em modo splitless (250 °C), com programação de temperatura de 50 °C por 1 min, aumentando 7 °C/min até 250 °C, permanecendo a esta temperatura por 10 min e Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. Para a determinação do índice de Kovats e coinjeções dos extratos com padrões sintéticos, também foram utilizadas as colunas capilares RTX-WAX (Restek, 30 m x 0,25 mm x 0.25 µm) e ECTM-1 (Alltech, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Para separações quirais foi utilizada a coluna capilar β-DEXTM 325 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) com temperatura inicial de 40 °C por um período de 100 min, seguido de acréscimo de 10 °/min até 220 °C.

. Os espectros de massas foram obtidos através de análises dos extratos por um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) modelo Shimadzu QP-2010 Plus com ionização por impacto de elétrons (70 eV). A coluna capilar e as condições de análises foram iguais às utilizadas nas análises de CG e a linha de transferência operou a 270 °C. Espectros de massas do banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST27 e NIST147) foram utilizados no auxílio à identificação estrutural dos compostos encontrados nos extratos.

Os extratos também foram analisados por um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC2010 acoplado a um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (CG-IVTF) DiscovIR-GC (Spectra Analysis, Marlborough, *Massachusetts*, USA; 4000-750

cm^{-1} , resolução, 8 cm^{-1}). A coluna capilar, modo de injeção e a programação de temperatura foram as mesmas descritas nas análises de anteriores.

1.3.5. Microderivatização

1.3.5.1. Hidrogenação⁴⁷

A reação foi realizada com a mistura de uma pequena quantidade de amostra (50uL) e ~ 0,5 mg de Pd/C (10%) como catalisador. Um balão cheio de H_2 foi conectado ao vidro que continha a mistura e a reação foi mantida de 8 a 10 h. A amostra reduzida foi filtrada e uma pequena alíquota foi analisada por CG-EM.

1.3.6. Estatísticas

Análises de variância (ANOVA) seguida de teste Tukey foram utilizadas para comparar as porcentagens dos compostos defensivos presentes nas DAGs e na MTG de *A. griseus*. Os testes foram realizados com o programa BioEstat versão 5.0.⁴⁸

1.3.7. Padrões sintéticos

(*E*)-2-Hexen-1-ol, (*E*)-2-octenal, (*E,Z*)-2,4-decadienal e (*E*)-2-decen-1-ol foi comprado da Acros Organics (Geel, Turnhout, Belgium). Undecano, dodecano, tridecano, tetradecano, pentadecano, 1-trideceno, 1-tetradecanol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metil-2-buten-1-ol, acetato de (*E*)-2-hexenila e acetato de (*E*)-2-octenila foram adquiridos da Aldrich

Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin, USA). (*S*)-2-metilbutan-1-ol foi enviado pela Prof^a. Dr^a. Arlene Correa Gonçalves, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. (*E*)-4-oxo-2-Hexenal e (*E*)-4-oxo-2-octenal foram gentilmente cedidos pelo Dr. K. Chauhan, USDA-ARS Beltsville, MD, USA.⁴⁹, e (*E*)-4-oxo-2-decenal foi enviado pelo Prof. Dr. J. G. Millar, University of California, Riverside, CA, USA⁵⁰.

Os aldeídos (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-decenal e tetradecanal foram preparados a partir de seus alcoóis precursores (9 mmol) em CH₂Cl₂ (6 mL), adicionando-os a uma suspensão sob agitação de PCC (2,94 g), NaOAc (0,23 g) e Celite (3 g) em CH₂Cl₂ (24 mL). Depois de a mistura ter sido agitada à temperatura ambiente durante 3 h, éter dietílico (20 mL) foi adicionado e a mistura foi em coluna contendo celite, carvão ativado e sílica. O filtrado foi lavado sucessivamente com água (10 mL) e solução saturada de NaCl (10 mL), seca com NaSO₄ anidro, e o solvente evaporado a vácuo (rendimento ~ 70%).⁵¹

Os acetatos de 2-metilbutila, (*S*)-2-metilbutila, 3-metil-2-butenila, (*E*)-2-hexenila, (*E*)-2-octenila e (*E*)-2-decenila foram preparados através de uma mistura dos respectivos alcoóis precursores (1 equivalente), anidrido acético (2 equiv.), trietilamina (2 equiv), e 4-(dimetilamino)piridina (quantidade catalítica) que foi mantida em agitação por 24 h à temperatura ambiente. Éter e solução de HCl 2 mol.L⁻¹ foram adicionados à mistura e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃, seca com NaSO₄ anidro, e o solvente evaporado a vácuo (rendimento > 90%).⁴⁴

1.4. RESULTADOS

1.4.1. Glândulas abdominais dorsais

Nas análises cromatográficas realizadas com os extratos das exúvias (Figura 18), foi possível observar um total de oito compostos para a espécie *P. macunaima*, oito compostos para *P. stictica* e nove compostos para *A. griseus*.

As estruturas químicas destes compostos foram propostas a partir de comparações dos espectros de massas com o banco de dados NIST27 e NIST147 e comparações dos índices de Kovats (KI) com a literatura.⁵² A confirmação destas estruturas se deu através da coinjeção dos extratos com padrões sintéticos.

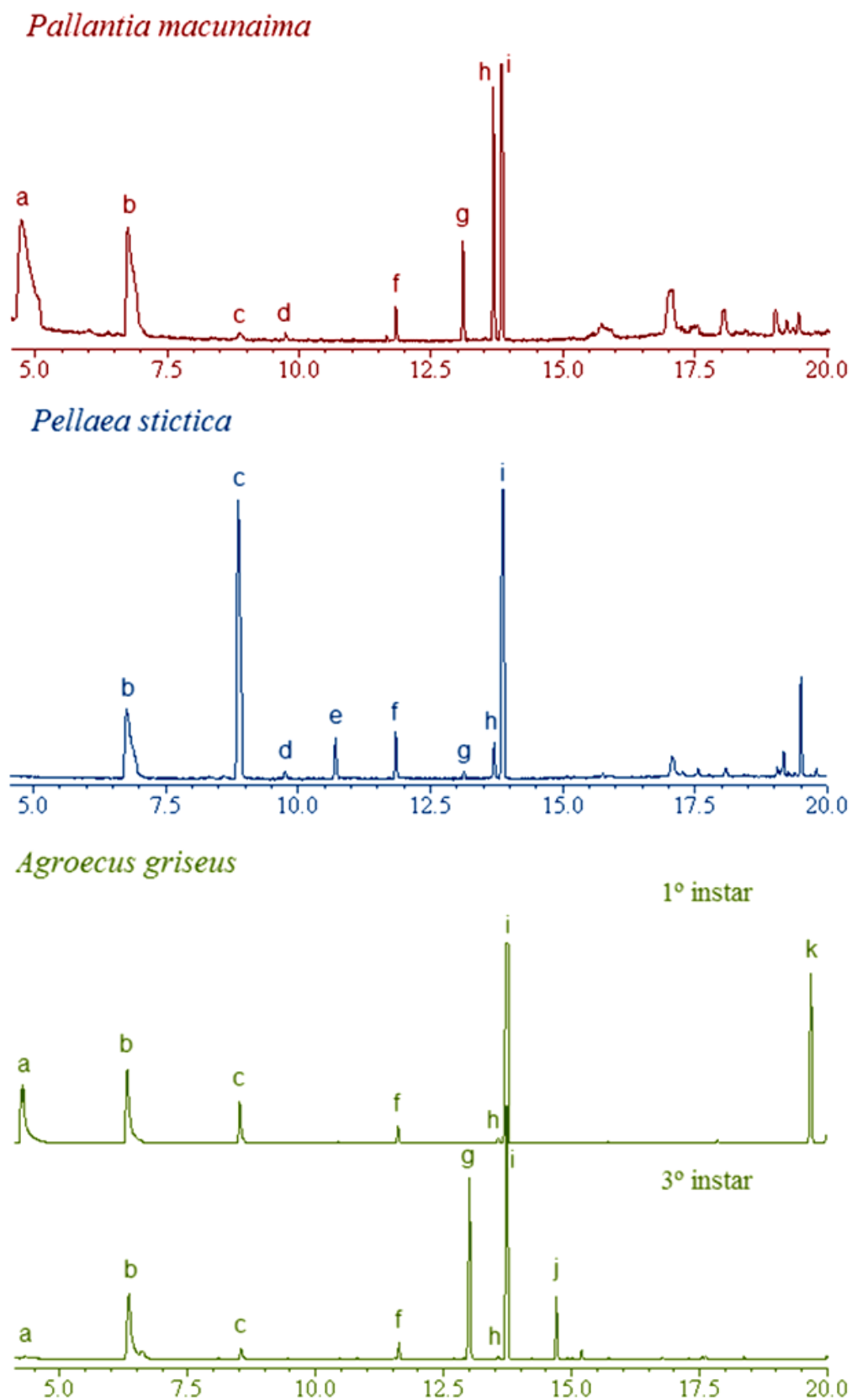


Figura 18. Exemplos de cromatogramas obtidos nas análises dos extratos de exúvias de *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*.

O composto **a** foi identificado como sendo o (*E*)-2-hexenal. O seu espectro de massas (Figura 19) apresentou o íon molecular em m/z 98 (16%) além de fragmentos característicos de aldeídos. Entre eles estão os fragmentos em m/z 97 (8%), m/z 80 (11%), m/z 69 (51%) e m/z 55 (67%) relativos à perda de um hidrogênio (M-1), de uma molécula de água (M-18), de um grupo etila (M-29) e de um grupo propila (M-43), respectivamente. O pico base em m/z 41 (100%) é devido à quebra alílica, favorecida pela dupla ligação.

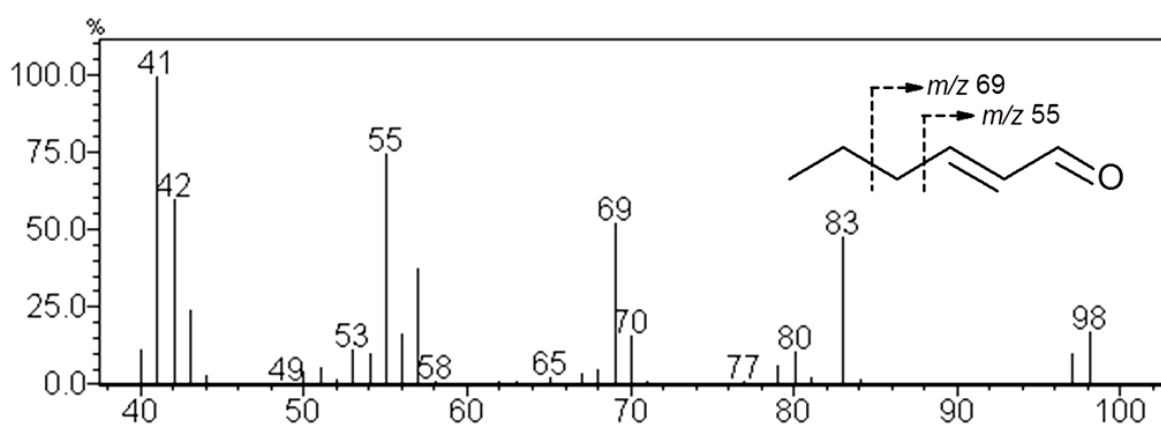


Figura 19. Espectro de massas do composto **a**.

Os espectros de massas dos compostos **c**, **g** e **k** também apresentaram os fragmentos típicos de aldeídos e foram identificados como (*E*)-2-octenal [m/z (%): 125 (M-1, <1), 108 (M-18, 4), 70 (88), 57 (60), 55 (M-43, 95), 43 (20), 41 (100); Página 158]; (*E*)-2-decenal [m/z (%): 153 (M-1, <1), 136 (M-18, 3), 70 (95), 57 (60), 55 (M-43, 87), 43 (100), 41 (97); Página 160] e tetradecanal [m/z (%): 194 (M-18, 2), 168 (M-44, 10), 96 (65), 82 (99), 57 (100), 55 (68), 43 (82), 41 (66); Página 161], respectivamente.

O composto **b** foi identificado através da comparação de espectros de massas obtidos nos estudos realizados por Zarbin e colaboradores⁵³ com o feromônio de alarme do percevejo *Piezodorus guildinii*. Este composto apresentou espectro de massas (Figura 20) análogo ao

espectro do (*E*)-4-oxo-2-hexenal [m/z (%): 112 (11), M^+ ; 97 (4), CHOCHCHCOCH_2^+ ; 83 (100), CHOCHCHCO^+ ; 55 (78), CHOCHCH^+].

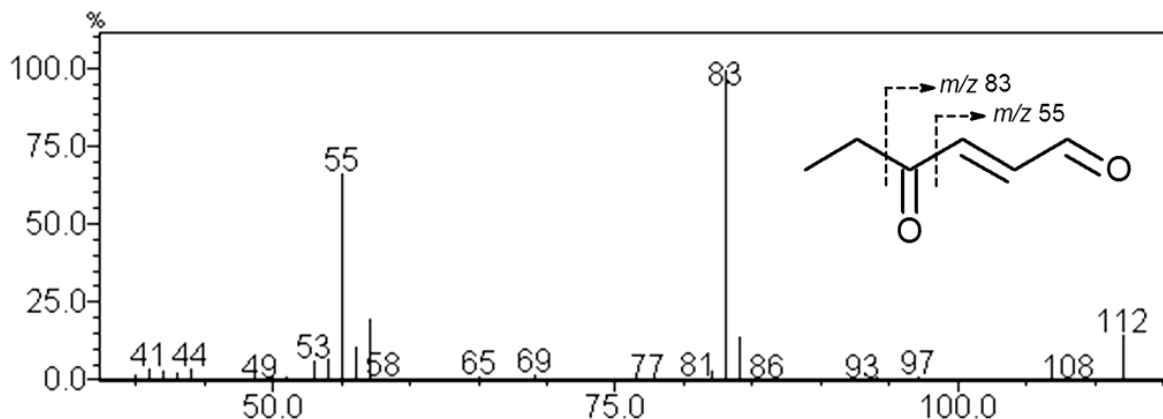


Figura 20. Espectro de massas do composto **b**.

Os compostos **e** e **j** apresentaram em seus espectro de massas os fragmentos m/z 55 e m/z 83, que são característicos para 4-oxo-2-alcenais. Através destes fragmentos e da comparação do perfil dos espectros de massas com os descritos por Moreira & Millar⁵⁰, o composto **e** foi identificado como (*E*)-4-oxo-2-octenal [m/z (%): 140 (M^+ , 1), 125 (9), 111 (59), 98 (66), 97 (16), 83 (54), 70 (40), 57 (34), 56 (17), 55 (100); Página 159] e o composto **j** como (*E*)-4-oxo-2-decenal [m/z (%): 168 (M^+ , 1), 139 (69), 125 (21), 98 (79), 83 (71), 70 (69), 55 (100), 43 (88), 41 (51) Página 160].

Os compostos **d**, **f** e **i** apresentaram espectros de massas típicos de alcanos, com os principais fragmentos em intervalos de 14 unidades, e foram identificados como sendo o undecano, dodecano e tridecano, respectivamente. O padrão de fragmentação do undecano (**d**) [m/z (%): 156 (M^+ , 4), 85 (22), 71 (41), 57 (100), 43 (81); Página 158], dodecano (**f**) [m/z (%): 170 (M^+ , 4), 85 (26), 71 (52), 57 (100), 43 (81); Página 159] e tridecano (**i**, Figura 21) [m/z (%): 184 (M^+ , 5), 85 (33), 71 (59), 57 (100), 43 (78)] foram similares. Para todos eles, foi observado o íon molecular que é comum em hidrocarbonetos de cadeia longa,

embora com baixa intensidade.⁵⁴ Também foi observado o pico base em m/z 57, sugerindo o fragmento *n*-butil, e os fragmentos intensos em m/z 43, 71 e 85, relativos aos fragmentos *n*-propil, *n*-pentil e *n*-hexil, respectivamente.

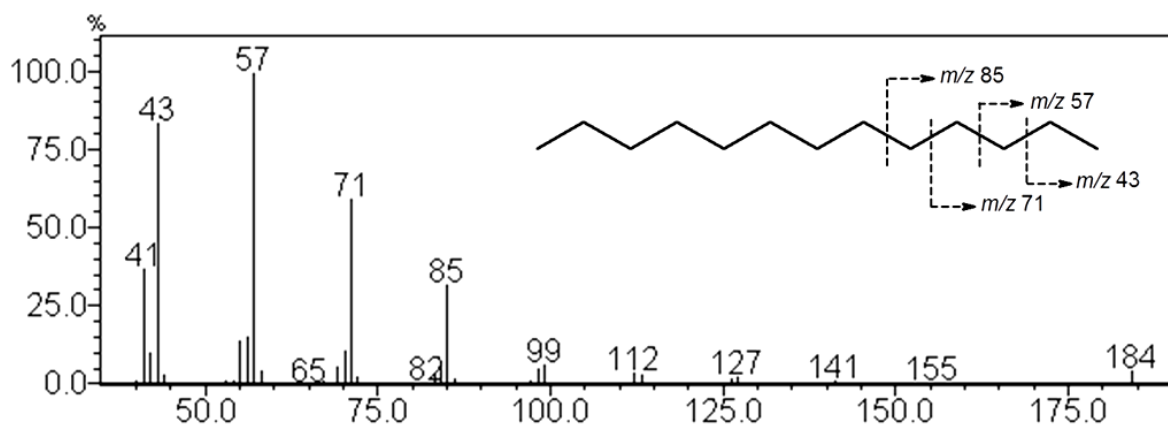


Figura 21. Espectro de massas do composto **i**.

Com o espectro de massas do composto **h** (Figura 22) chegou-se à estrutura do 1-trideceno. Esta estrutura foi atribuída, principalmente, através do íon molecular em m/z 182 (14%) e dos fragmentos m/z 41 (93%) ($C_3H_5^+$), 55 (100%) ($C_4H_7^+$), 69 (73%) ($C_5H_9^+$), 83 (53%) ($C_6H_{11}^+$), 97 (35%) ($C_7H_{13}^+$) e 111 (13%) ($C_8H_{15}^+$).

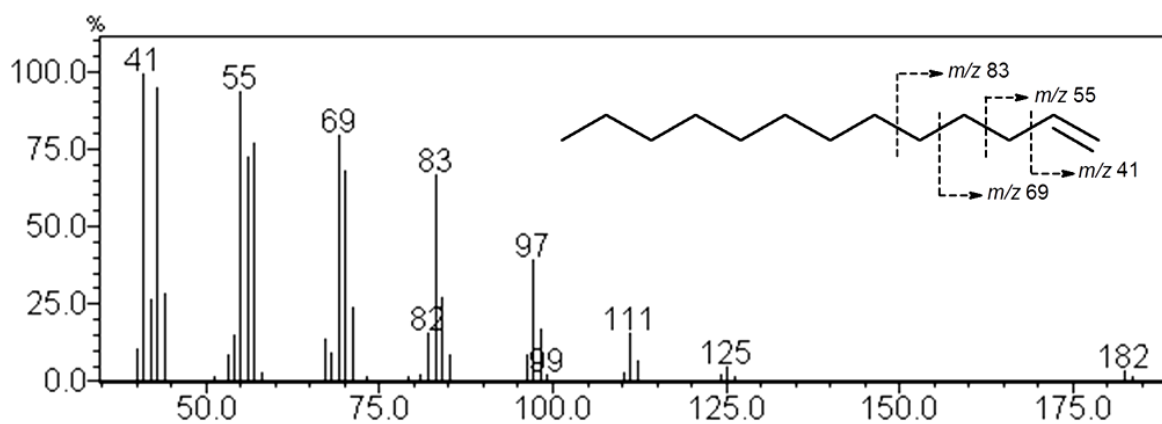


Figura 22. Espectro de massas do composto **h**.

Nas análises cromatográficas dos extratos das exúvias da espécie *P. macunaima*, as proporções em que os compostos estão presentes na mistura feromonal dos cinco ínstaros apresentaram variações, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de *Pallantia macunaima*, de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3)

	Composto	1º instar	2º instar	3º instar	4º instar	5º instar
a	(E)-2-Hexenal*	0 a	19,6 \pm 1,9b	20,8 \pm 0,6b	25,2 \pm 2,2bc	33,6 \pm 6,8c
b	(E)-4-Oxo-2-hexenal*	31,9 \pm 0,8a	18,7 \pm 2,4b	13,2 \pm 3,5b	8,6 \pm 0,8b	8,3 \pm 7,5b
c	(E)-2-Octenal	0 a	0,7 \pm 0,1a	0,4 \pm 0,1a	0,5 \pm 0,1a	1,4 \pm 1,1a
d	Undecano	0 a	0,1 \pm 0,0a	0,2 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,0a	0,7 \pm 0,5a
f	Dodecano*	0 a	0,8 \pm 0,2b	1,0 \pm 0,1b	1,1 \pm 0,2b	1,2 \pm 0,1b
g	(E)-2-Decenal*	27,4 \pm 1,5a	12,1 \pm 1,0b	7,2 \pm 0,6b	7,2 \pm 2,0b	8,0 \pm 3,3b
h	1-Trideceno	10,6 \pm 1,0a	13,3 \pm 1,2a	15,1 \pm 0,1a	13,6 \pm 1,6a	11,3 \pm 2,3a
i	Tridecano	30,1 \pm 2,0a	34,6 \pm 2,5a	42,1 \pm 4,3a	43,6 \pm 3,4a	35,4 \pm 8,3a

*Compostos que apresentaram diferenças significativas entre os instares. Teste Tukey (p<0,05).

(E)-4-Oxo-2-hexenal (**b**) e tridecano (**i**) são os compostos presentes em maior concentração, seguidos por menores quantidades de (E)-2-decenal (**g**) e 1-trideceno (**h**). O composto majoritário a partir do segundo instar é o tridecano (**i**), seguido por significantes proporções de (E)-2-hexenal (**a**), (E)-4-oxo-2-hexenal (**b**), (E)-2-decenal (**g**), 1-trideceno (**h**), além de traços de (E)-2-octenal (**c**), undecano (**d**) e dodecano (**f**). Com o aumento da fase ninfal, quatro compostos variaram significativamente suas proporções relativas nos extratos

das exúvias: (*E*)-2-hexenal (**a**), dodecano (**f**), (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**b**) e (*E*)-2-decenal (**g**), os primeiros dois compostos aumentam e os dois últimos diminuem com o aumento do instar.

Nos resultados quantitativos da espécie *P. stictica* todos os extratos dos cinco ínstaros são compostos principalmente por tridecano (**i**), componente majoritário, (*E*)-2-octenal (**c**), composto que apresenta a segunda maior proporção, e (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**b**) (Tabela 4). Também fazem parte dessa mistura feromonal, pequenas proporções de (*E*)-4-oxo-2-octenal (**e**), dodecano (**f**) e 1-trideceno (**h**), somado a traços de undecano (**d**) e (*E*)-2-decenal (**g**).

Foi possível observar grandes variações nas proporções dos compostos com o aumento do instar, principalmente para aqueles que aparecem em maiores concentrações. Entretanto, para esta espécie não foi possível estabelecer um padrão de variação, pois houve grande oscilação das proporções. Como exemplo, o tridecano (**i**) aumentou sua proporção do primeiro para o segundo instar e a partir do terceiro instar voltou a diminuir.

Tabela 4. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de *Pellaea stictica*, de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3)

	Composto	1º instar	2º instar	3º instar	4º instar	5º instar
b	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-hexenal	13,9 \pm 4,80a	3,3 \pm 2,7a	5,6 \pm 3,2a	5,2 \pm 4,5a	4,7 \pm 2,0a
c	(<i>E</i>)-2-Octenal	32,3 \pm 1,38a	17,7 \pm 1,9a	17,7 \pm 3,8a	22,1 \pm 9,3a	32,0 \pm 8,4a
d	Undecano	0 a	0,2 \pm 0,0a	0,2 \pm 0,1a	0,4 \pm 0,3a	0,5 \pm 0,2a
e	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-octenal	2,9 \pm 2,3a	0,5 \pm 0,1a	1,0 \pm 0,7a	0,5 \pm 0,2a	0,7 \pm 0,3a
f	Dodecano	1,3 \pm 0,4a	1,7 \pm 0,4a	1,6 \pm 0,2a	2,1 \pm 0,2a	2,0 \pm 0,4a
g	(<i>E</i>)-2-Decenal*	1,1 \pm 0,2a	0,1 \pm 0,0b	0,1 \pm 0,0b	0,2 \pm 0,1b	0,1 \pm 0,0b
h	1-Trideceno*	0,6 \pm 0,2a	1,3 \pm 0,1ab	1,3 \pm 0,3ab	2,4 \pm 0,8ab	4,0 \pm 1,7b
i	Tridecano	48,0 \pm 8,8a	75,2 \pm 4,2a	72,4 \pm 7,1a	67,3 \pm 15,2a	55,7 \pm 10,2a

*Compostos que apresentaram diferenças significativas entre os ínstaros. Teste Tukey (p<0,05).

De acordo com a Tabela 5, os resultados das análises de variância mostraram que as proporções dos compostos na mistura feromonal dos 5 ínstaros de *A. griseus* também apresentaram algumas variações, principalmente se comparado o primeiro com os demais ínstaros. Pode-se observar que a partir do segundo instar houve o surgimento do (*E*)-2-hexenal (**a**) e do tetradecanal (**k**), e o desaparecimento de (*E*)-2-decenal (**g**) e (*E*)-4-oxo-2-decenal (**j**). Três outros compostos tiveram um aumento significativo nas proporções em que se encontram na mistura feromonal dos últimos ínstaros: o (*E*)-2-octenal (**c**), o dodecano (**f**) e o tridecano (**i**) que, mesmo com a mudança na concentração, continuou sendo o composto de defesa majoritário para todos os ínstaros.

Tabela 5. Abundância relativa (%) dos compostos presentes nos extratos das exúvias de *Agroecus griseus*, de ninfas do primeiro ao quinto instar. (média \pm desvio padrão) (n = 3)

	Composto	1º instar	2º instar	3º instar	4º instar	5º instar
a	(<i>E</i>)-2-Hexenal*	0 a	15,93 \pm 0,66b	13,94 \pm 1,30b	16,47 \pm 1,93b	14,02 \pm 0,31b
b	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-hexenal*	18,20 \pm 1,79a	18,27 \pm 2,80a	10,69 \pm 2,55b	15,92 \pm 9,02ab	3,86 \pm 1,94c
c	(<i>E</i>)-2-Octenal*	1,34 \pm 0,47a	1,41 \pm 0,12a	3,89 \pm 0,48ab	6,47 \pm 1,19b	7,45 \pm 1,54b
f	Dodecano*	1,11 \pm 0,40ab	0,89 \pm 0,07a	1,43 \pm 0,11ab	1,51 \pm 0,23ab	2,12 \pm 0,28b
g	(<i>E</i>)-2-Decenal*	31,83 \pm 2,25a	0 b	0 b	0 b	0 b
h	1-Trideceno	0,16 \pm 0,11a	0,36 \pm 0,15a	0,82 \pm 0,15a	0,67 \pm 0,03a	0,67 \pm 0,20a
i	Tridecano*	43,87 \pm 2,82a	42,96 \pm 1,89a	48,40 \pm 4,87ab	41,34 \pm 8,53a	63,30 \pm 2,92b
j	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-decenal*	3,50 \pm 1,55a	0 b	0 b	0 b	0 b
k	Tetradecanal*	0 a	20,18 \pm 1,07b	20,83 \pm 1,78b	17,62 \pm 4,02bc	8,58 \pm 5,54ac

*Compostos que apresentaram diferenças significativas entre os ínstaros. Teste Tukey (p<0,05).

1.4.2. Glândula metatorácica

Os extratos da MTG de machos e fêmeas das três espécies apresentaram resultados compatíveis com outros Pentatomidae.¹¹ Além dos compostos que também foram descritos para as ninfas (**a** - **d**, **f** - **i**), com exceção do (*E*)-4-oxo-2-octenal (**e**), 4-oxo-2-decenal (**j**) e tetradecanal (**k**), houve o aparecimento de oito novos componentes (**l** - **s**, Figura 23).

Seis destes novos compostos também foram identificados através de comparações dos espectros de massas com o banco de dados NIST27 e NIST147 e comparações dos índices de Kovats (KI) com a literatura.⁵² No entanto, espectros de massas correspondentes aos compostos **l** e **m** não foram encontrados na literatura, e suas estruturas foram identificados por uma combinação de microderivatizações e análises por CG-EM e CG-IVTF.

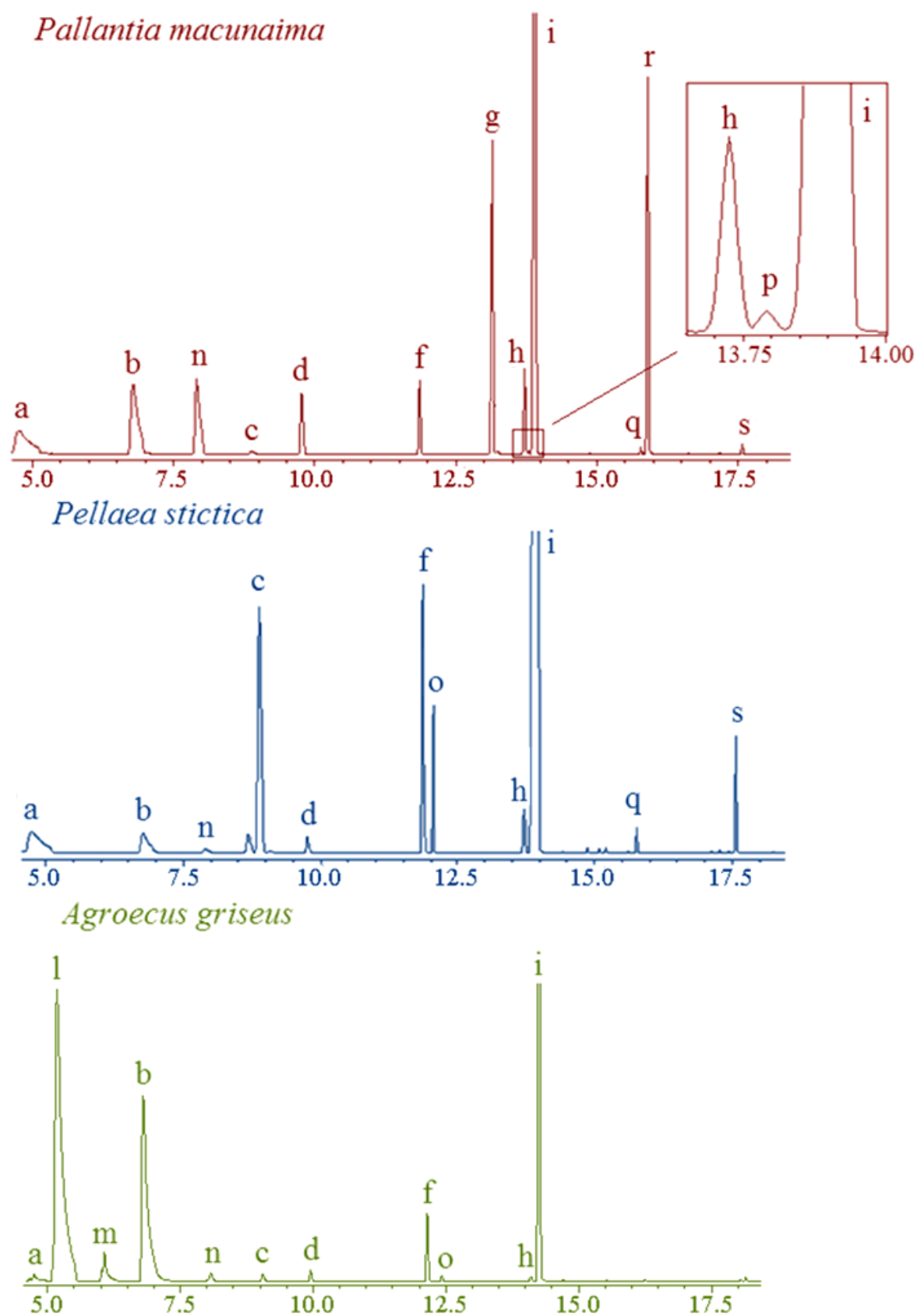


Figura 23. Exemplos de cromatogramas dos extratos das MTG de adultos das espécies *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*.

Analisando o espectro de infravermelho do composto **I** (Figura 24), foi possível observar três bandas características de ésteres em 1044 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} e 1742 cm^{-1} , que se referem aos estiramentos O-C-C, C-O-C e C=O, respectivamente.⁵⁵

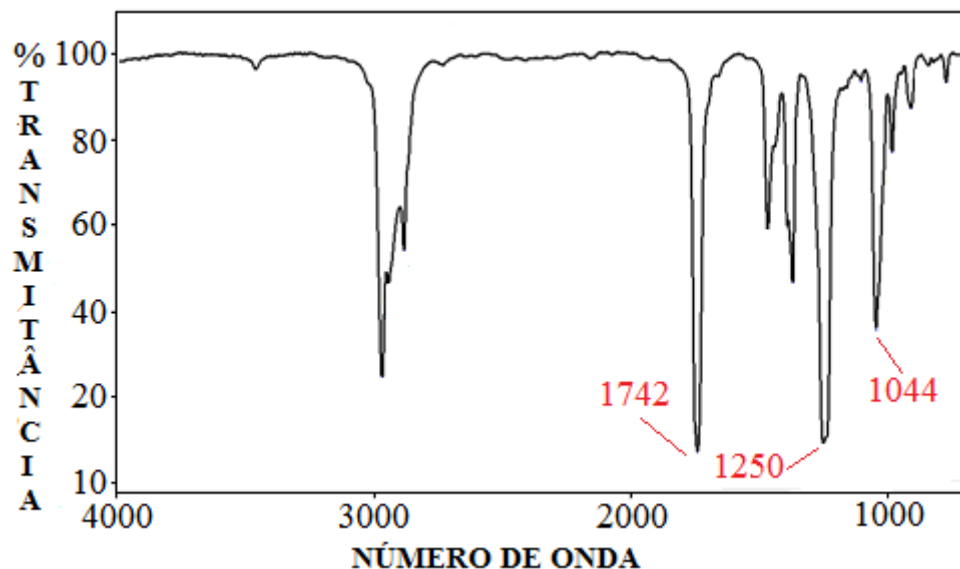


Figura 24. Espectro de infravermelho do composto **I**.

O espectro de massas deste composto (Figura 25) apresentou o fragmento do íon molecular ($M^+ + 1$) em m/z 131, o fragmento m/z 70 decorrente da perda de um ácido acético ($M-60$), característico da presença de acetato, e pico base em m/z 43, decorrente da quebra da ligação simples C-O de ésteres.⁵⁴

Com a comparação do espectro de massas deste composto com o banco de dados NIST, somado aos dados da análise de infravermelho, foram sugeridas duas possíveis estruturas químicas, os acetatos de 2-metilbutila e 3-metilbutila. A partir da coinjeção do extrato com os padrões sintéticos em três diferentes colunas (EC-1, RTX-5 e RTX-WAX), foi possível determinar a estrutura química do composto **I** como o acetato de 2-metilbutila.

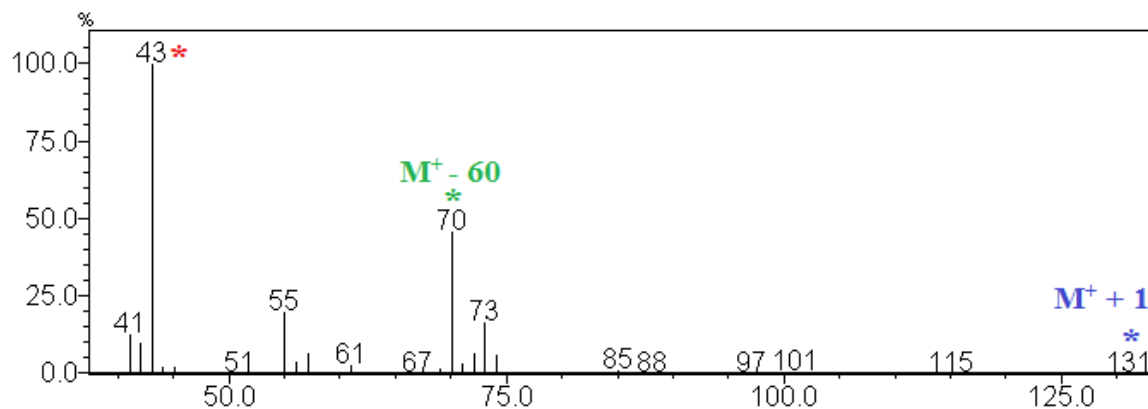


Figura 25. Espectro de massas do composto **1**.

Para estabelecer a configuração absoluta desta molécula, foram realizadas análises em CG com coluna cromatográfica com fase estacionária quiral. O composto **1** racêmico foi resolvido por uma coluna capilar de caráter quiral baseada em ciclodextrina, resultando em dois picos com tempos de retenção em 39,5 e 40,6 minutos, como pode ser visto na Figura 26. O padrão sintético (*S*)-**1** coeluiu com o primeiro pico e o composto natural teve mesmo tempo de retenção deste composto. Desta forma, o acetato **1** presente no conteúdo da MTG de *A. griseus* foi caracterizado como o acetato de (*S*)-2-metilbutila.

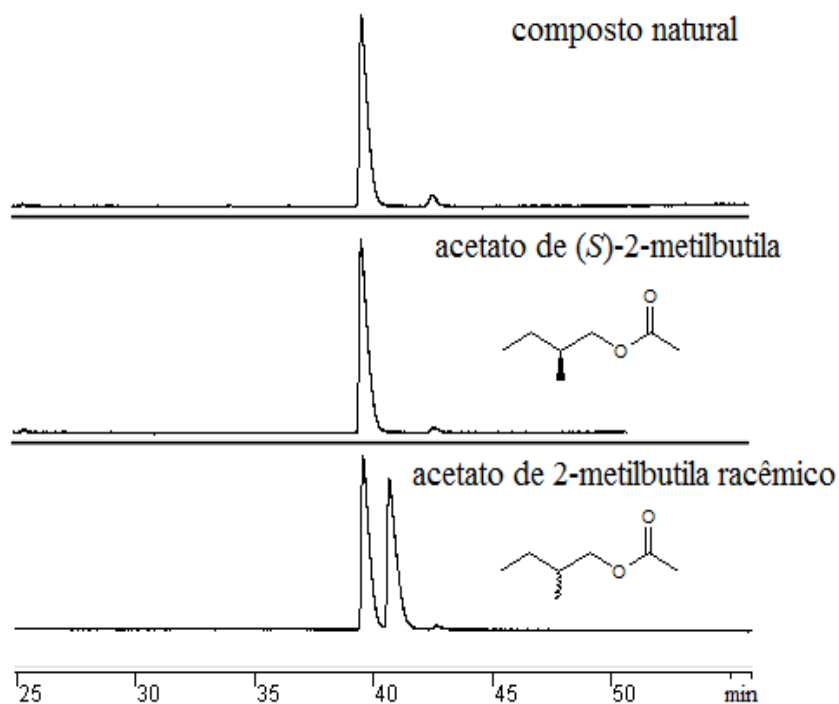


Figura 26. Resolução enantiomérica do acetato de 2-metilbutila (**j**) em coluna capilar β -DEX™ 325.

Além das bandas características dos ésteres (Figura 27) em 1026 cm^{-1} (O-C-C), 1248 cm^{-1} (C-O-C) e 1742 cm^{-1} (C=O), o composto **m** apresentou no seu espectro de infravermelho, duas outras bandas que juntas caracterizam uma dupla ligação trissubstituída, 825 cm^{-1} (C=C) e 1682 cm^{-1} (C-H) ⁵⁵.

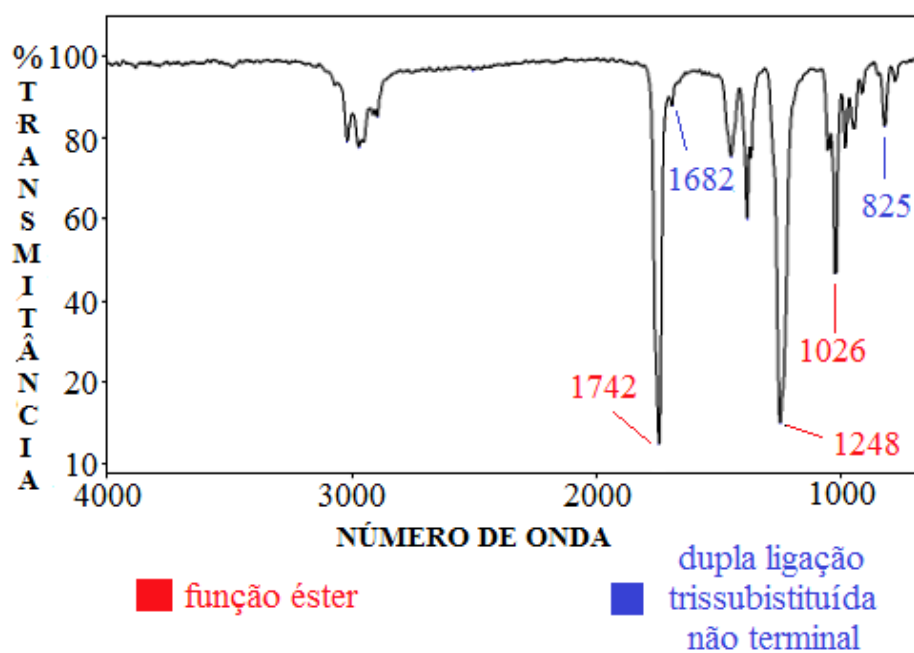


Figura 27. Espectro de infravermelho do composto **m**.

Na análise do espectro de massas deste composto (Figura 28), foi possível observar o pico do íon molecular em m/z 128 (M^+), o pico base em m/z 43 e outro fragmento intenso resultante da perda do ácido acético em m/z 68 ($M^+ - 60$).⁵⁴ A partir dos dados descritos acima e comparação com o banco de dados NIST, foi possível propor duas diferentes estruturas químicas, o acetato de 2-metil-2-butenila e o acetato de 3-metil-2-butenila.

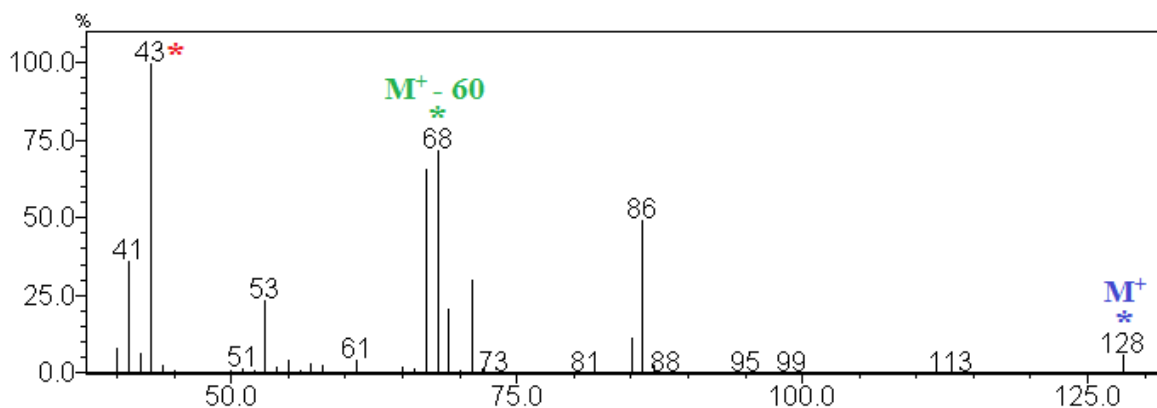


Figura 28. Espectro de massas do composto **m**.

Para determinar a estrutura correta, o composto natural foi hidrogenado sobre Pd/C e o produto foi coinjetado em três diferentes colunas com os acetatos de 2-metilbutila e 3-metilbutila. Estas análises possibilitaram identificar o composto **m** como acetato de 3-metil-2-butenila, cujos dados analíticos foram idênticos ao do padrão sintético.

O composto **n** foi identificado como sendo o acetato de (*E*)-2-hexenila (Figura 29). Essa identificação resultou da análise dos fragmentos do seu espectro de massas, que apresentou como fragmentos característicos o íon molecular em m/z 142 (<1%), a perda de um ácido acético (M-60) em m/z 82 (24%) e o pico base em m/z 43 (100%). Os compostos **o** e **r** também apresentaram espectros de massas característicos de acetatos, com pico base em m/z 43 e o fragmento relativo à M-60, sendo caracterizados como acetato de (*E*)-2-octenila [m/z (%): 170 (M⁺, <1), 110 (M-60, 9), 41 (25), 43 (100); Página 161] e acetato de (*E*)-2-decenila [m/z (%): 198 (M⁺, <1), 138 (M-60, 4), 41 (25), 43 (100); Página 162], respectivamente.

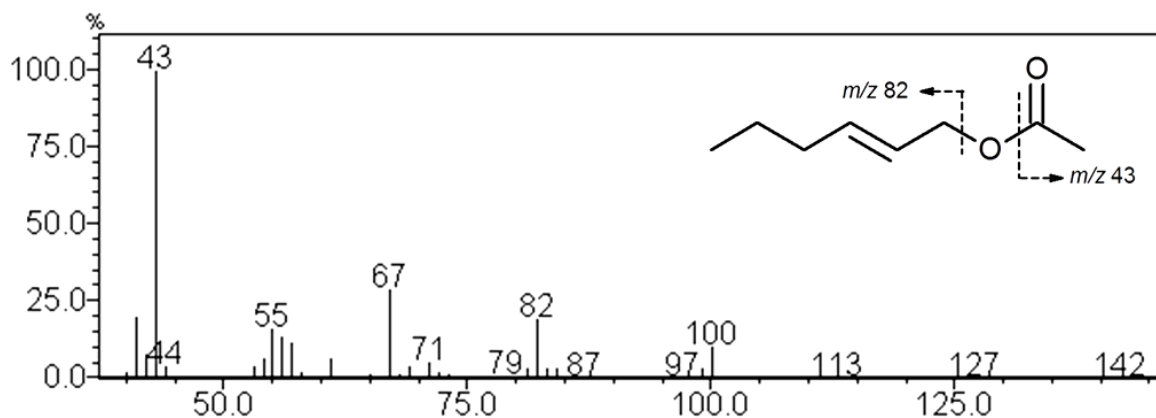


Figura 29. Espectro de massas do composto **n**.

O composto **p** apresentou o fragmento do pico base em m/z 81 (100%), o íon molecular em m/z 152 (7%) e o fragmento m/z 67 (25%) característico em dienos (Figura 30), sendo identificado como o (*E,Z*)-2,4-decadienal.

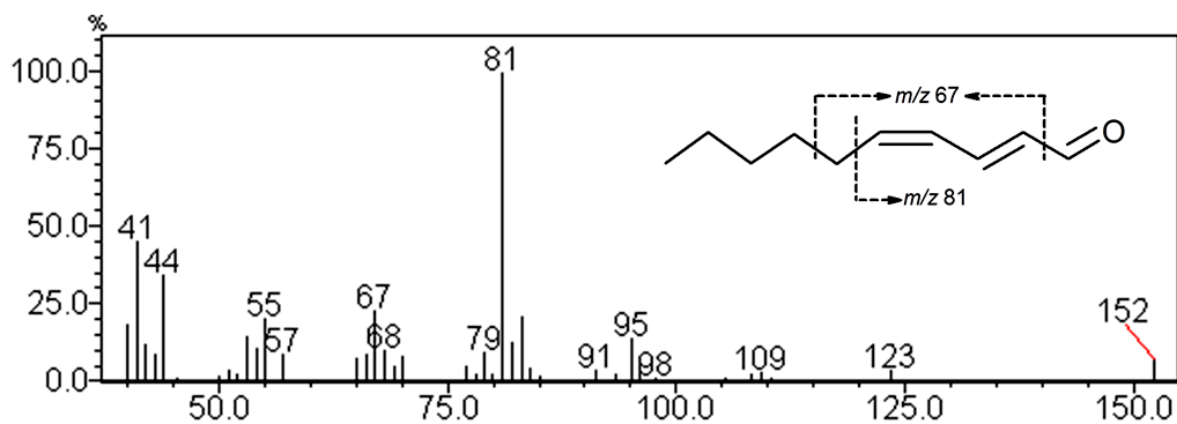


Figura 30. Espectro de massas do composto **p**.

Já os compostos **q** e **s** apresentaram espectros de massas característicos de alcanos, com os principais fragmentos em intervalos de 14 unidades, e foram identificados como tetradecano [m/z (%): 198 (M^+ , 5), 85 (34), 71 (61), 57 (100), 43 (75); Página 162] e

pentadecano [m/z (%): 212 (M^+ , 5), 85 (34), 71 (62), 57 (100), 43 (76); Página 163], respectivamente.

Todas as estruturas químicas identificadas dos compostos defensivos de ninfas e adultos *P. macunaima*, *P. stictica* e *A. griseus* podem ser visualizadas na Figura 31 e a comparação dos respectivos índices de Kovats com os descritos na literatura, na Tabela 6.

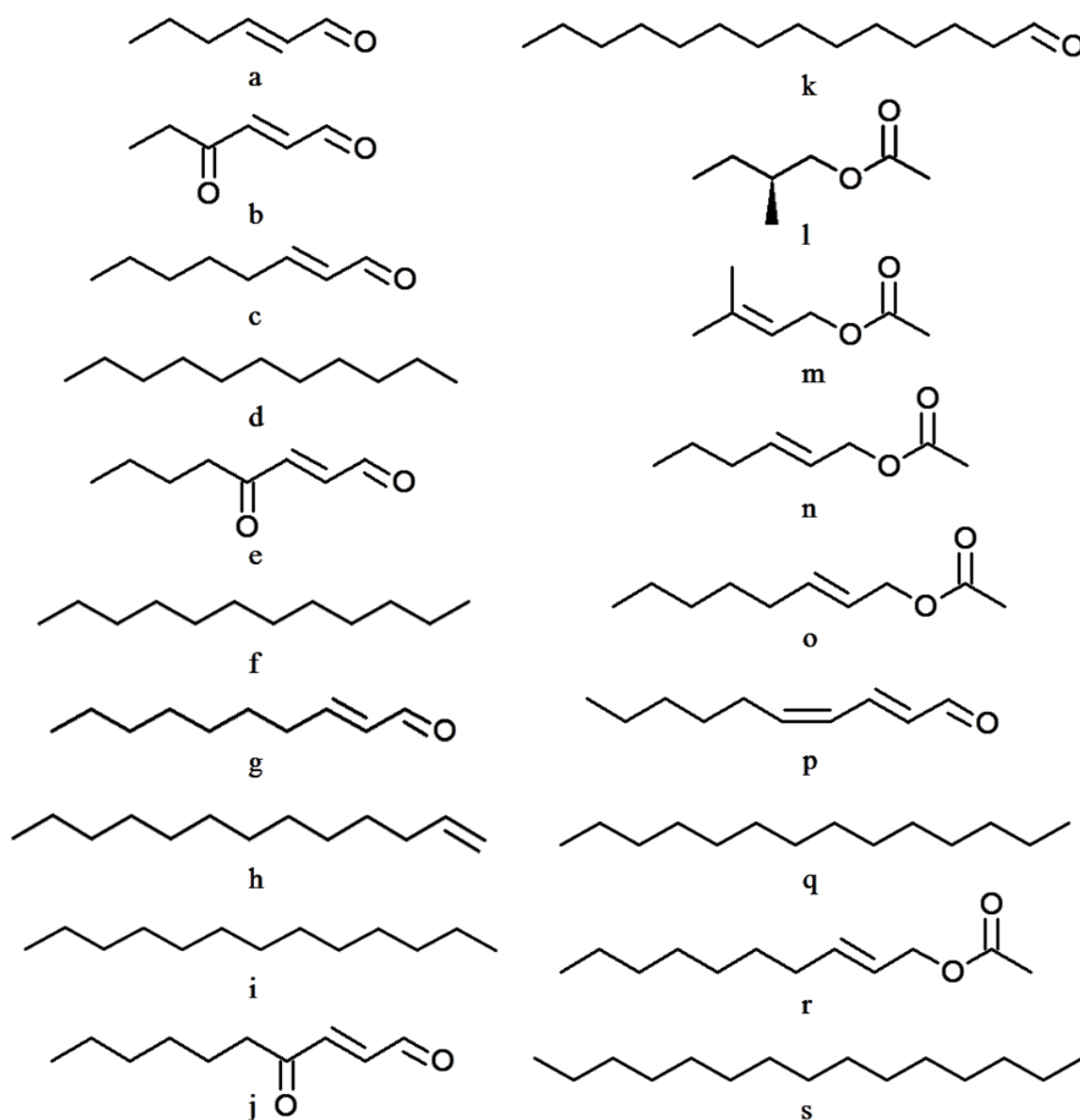


Figura 31. Estrutura química dos compostos defensivos presentes nas DAGs de ninfas e na MTG de adultos *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*.

Tabela 6. Tempos de retenção (t_R) e comparação dos índices de Kovats (KI) calculados para os compostos presentes no conteúdo das DAGs de ninfas e MTG de adultos das espécies *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*, com os da ref. 19.

	Compostos	KI	KI
		Natural	Literatura
a	(<i>E</i>)-2-Hexenal	858	855
b	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-hexenal	955	--
c	(<i>E</i>)-2-Octenal	1055	1054
d	Undecano	1097	1100
e	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-octenal	1043	--
f	Dodecano	1198	1200
g	(<i>E</i>)-2-Decenal	1260	1263
h	1-Trideceno	1288	1291
i	Tridecano	1296	1300
j	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-decenal	1350	--
k	Tetradecanal	1610	1612
l	Acetato de (<i>S</i>)-2-metilbutila	--	881
m	Acetato de 3-metil-2-butenila	--	--
n	Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila	1010	1013
o	Acetato de (<i>E</i>)-2-octenila	1209	1209
p	(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	1293	1292
q	Tetradecano	1399	1400
r	Acetato de (<i>E</i>)-2-decenila	1407	1408
s	Pentadecano	1498	1500

Os extratos da MTG de machos e fêmeas da mesma idade da espécie *P. macunaima* apresentaram similaridade na composição e proporção dos compostos, com o tridecano (**i**) sendo o constituinte mais abundante (Tabela 7). Entretanto, foram observadas diferenças nas proporções dos compostos entre insetos de diferentes idades, principalmente (*E*)-2-hexenal (**a**) e acetato de (*E*)-2-hexenila (**n**), que tiveram um decréscimo significativo de suas proporções entre 10 e 20 dias de idade adulta. Não foram observadas diferenças significativas entre os insetos com 20 e 30 dias, nem dimorfismo na secreção entre MTG de machos e fêmeas.

Para *P. stictica*, a composição do conteúdo da MTG também é composta por hidrocarbonetos, aldeídos, ésteres e oxo-alcenal. Os resultados obtidos também não apresentaram diferenças significativas nas proporções entre machos e fêmeas, mas esta diferença pode ser encontrada comparando as três idades estudadas, 10, 20 e 30 dias (Tabela 8). O tridecano (**i**) aparece novamente como componente majoritário do conteúdo das glândulas metatorácica, somado a concentrações relevantes de (*E*)-2-octenal (**c**). As variações significativas nas proporções dos componentes da mistura feromonal são observadas para o 1-trideceno (**h**), que aumenta de 10 para 20 dias e volta a diminuir em 30 dias, e para o acetato de (*E*)-2-octenila (**o**), que diminui após 10 dias.

Tabela 7. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de *Pallantia macunaima*. (média \pm desvio padrão, N=5)

	Composto	10 dias	20 dias	30 dias
a	(E)-2-Hexenal*	4,3 \pm 2,1a	1,3 \pm 0,6b	1,3 \pm 0,9b
b	(E)-4-Oxo-2-hexenal	9,9 \pm 2,5a	12,7 \pm 8,1a	11,3 \pm 5,3a
c	(E)-2-Octenal	0,2 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,1a
d	Undecano	2,2 \pm 0,5a	1,8 \pm 0,3a	2,0 \pm 0,8a
f	Dodecano	1,6 \pm 0,3a	1,7 \pm 0,4a	2,1 \pm 0,7a
g	(E)-2-Decenal	17,9 \pm 6,5a	21,7 \pm 4,6a	17,9 \pm 3,3a
h	1-Trideceno	2,0 \pm 0,2a	1,7 \pm 0,7a	1,9 \pm 0,9a
i	Tridecano	56,8 \pm 8,9a	58,3 \pm 11,4a	62,7 \pm 6,3a
n	Acetato de (E)-2-hexenila	1,5 \pm 1,8a	0,3 \pm 0,2a	0,2 \pm 0,1a
p	(E,Z)-2,4-Decadienal	0,2 \pm 0,1a	0,2 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,2a
q	Tetradecano	0,1 \pm 0,0a	0,1 \pm 0,0a	0,1 \pm 0,0a
r	Acetato de (E)-2-decenila*	4,7 \pm 3,0a	1,5 \pm 0,7b	1,2 \pm 0,8b
s	Pentadecano	0,2 \pm 0,1a	0,2 \pm 0,1a	0,3 \pm 0,1a

*Compostos com diferenças significativas entre os ínstares. Teste Tukey (p<0,05).

Tabela 8. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de *Pellaea stictica*. (média \pm desvio padrão, N=5)

	Composto	10 dias	20 dias	30 dias
a	(<i>E</i>)-2-Hexenal	1,21 \pm 0,69a	2,34 \pm 1,71a	1,50 \pm 1,46a
b	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-hexenal	0,19 \pm 0,33a	2,31 \pm 1,46a	2,36 \pm 2,65a
c	(<i>E</i>)-2-Octenal	6,04 \pm 1,73a	11,01 \pm 4,42a	11,27 \pm 7,05a
d	Undecano	0,23 \pm 0,04a	0,34 \pm 0,08a	0,26 \pm 0,09a
f	Dodecano	2,72 \pm 0,57a	3,30 \pm 0,82a	3,25 \pm 0,98a
h	1-Trideceno*	0,65 \pm 0,13a	1,06 \pm 0,38b	0,69 \pm 0,17ab
i	Tridecano	86,60 \pm 3,10a	77,12 \pm 5,84a	77,64 \pm 9,14a
n	Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila	0,24 \pm 0,36a	0,03 \pm 0,05a	0,04 \pm 0,09a
o	Acetato de (<i>E</i>)-2-octenila*	0,65 \pm 0,54a	0,19 \pm 0,18b	0,13 \pm 0,17b
q	Tetradecano	0,17 \pm 0,05a	0,31 \pm 0,09a	0,28 \pm 0,13a
s	Pentadecano	0,90 \pm 0,28a	1,39 \pm 0,60a	1,71 \pm 0,97a

*Compostos com diferenças significativas entre os instares. Teste Tukey ($p < 0,05$).

A mistura feromonal de *A. griseus* é baseada principalmente em 3 compostos (Tabela 9), o tridecano (**i**), que como nas ninfas é o composto majoritário, o acetato de (*S*)-2-metilbutila (**l**), que aparece quase na mesma proporção que o majoritário, e o (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**b**). Os demais componentes aparecem apenas em nível de traços. O estudo da variação da proporção dos compostos presentes no conteúdo da MTG desta espécie não foi realizado.

Tabela 9. Abundância relativa (%) dos compostos identificados na glândula metatorácica de percevejos adultos (30 dias) de *Agroecus griseus*. (média \pm desvio padrão, N=3)

Composto		30 dias		
a	(<i>E</i>)-2-Hexenal	2,28	\pm	1,64
l	Acetato de (<i>S</i>)-2-metilbutila	30,28	\pm	2,46
m	Acetato de 3-metil-2-butenila	4,11	\pm	0,22
b	(<i>E</i>)-4-Oxo-2-hexenal	14,95	\pm	2,24
n	Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenila	6,64	\pm	4,28
c	(<i>E</i>)-2-Octenal	0,52	\pm	0,02
d	Undecano	1,71	\pm	0,21
f	Dodecano	3,95	\pm	0,08
o	Acetato de (<i>E</i>)-2-octenila	0,70	\pm	0,20
h	1-Trideceno	1,42	\pm	0,06
i	Tridecano	33,48	\pm	1,40

*Compostos com diferenças significativas entre os instares. Teste Tukey ($p < 0,05$).

1.5. DISCUSSÃO

Os compostos encontrados no conteúdo das DAGs e MTG de *P. macunaima* e *P. stictica* já foram descritos anteriormente na química defensiva de outros percevejos²⁷. As misturas feromonais que contém os compostos defensivos são espécie-específicas e apresentam como principal diferença, a proporção em que os compostos se encontram na mistura. Para a maioria destes estudos, o tridecano aparece como composto majoritário seguido de compostos pertencentes aos grupos dos aldeídos, oxo-alcenais, ésteres, entre outros.²⁷ No entanto, o papel biológico da maioria destes compostos defensivos ainda necessita ser estudado.

Neste trabalho, também foram descritos os compostos defensivos presentes nas DAGs e na MTG do percevejo *A. griseus*. Além dos componentes defensivos descritos na literatura,²⁷ foram encontrados dois novos compostos, o acetato de (S)-2-metilbutila e o acetato de 3-metil-2-butenila. O acetato de 2-metilbutila é bastante citado em sua forma racêmica na composição de voláteis de plantas e o acetato de 3-metil-2-butenila foi citado apenas na química defensiva de um heteroptera, a espécie *Spilostethus rivulari* (Lygaeidae).⁵⁶⁻⁵⁷ No entanto, o estudo da composição do conteúdo da MTG em função da idade para esta espécie ainda precisa ser realizado.

Três aldeídos descritos aqui, (E)-2-hexenal (**a**), (E)-2-octenal (**c**) e (E)-2-decenal (**g**), já foram descritos em grandes concentrações para outras espécies de pentatomídeos e, além de serem relatados como compostos defensivos⁵⁸ e feromônios de alarme,^{39, 59} alguns deles podem ter a função de cairomônio. Como exemplo, o parasitóide *Telenomus podisi* utiliza o (E)-2-hexenal (**a**) para encontrar seu hospedeiro favorito, *Euschistus heros*.^{27, 60} Entretanto, (E)-2-hexenal é um composto volátil normalmente produzido por plantas e, é produzido em grande quantidade pela soja, principal hospedeira de *E. heros*. Assim, ainda não foi possível

determinar se o parasitóide responde a este composto como um sinal direto associado ao seu hospedeiro, ou como uma forma de localizar o habitat deste percevejo.²⁷

Os compostos (*E*)-2-hexenal (**a**), undecano (**d**), dodecano (**f**) e tridecano (**i**) são conhecidas toxinas, irritantes e repelentes, sendo liberados pelos percevejos quando são molestados. Este fato sugere que eles realmente atuam como defesa química para estas espécies, porém não é conhecida a interação entre estes vários compostos. Gunawardena⁶¹ relatou que (*E*)-2-hexenal (**a**) e tridecano causam mais efeito repelente quando combinados do que individualmente. Entretanto, outros alcanos, quando combinados com (*E*)-2-hexenal (**a**), não causam um efeito repelente tão efetivo quanto o tridecano (**i**).⁵³

Os 4-oxo-alcenais só foram descritos nos estudos dos compostos defensivos de pentatomídeos. Eles estão presentes em quantidades mais elevadas no conteúdo das DAGs de ninfas quando comparados com a MTG de insetos adultos.¹⁵ Estes compostos são responsáveis pela separação entre misturas feromonais de ninfas e adultos de pentatomídeos neotropicais.⁴¹

As secreções das DAGs de ninfas de primeiro instar de algumas espécies de percevejos contém (*E*)-4-oxo-2-decenal, que é totalmente ausente nas secreções a partir do segundo instar.²⁹ Este composto característico do primeiro instar é responsável por mediar comportamento de agregação,^{39, 44} que também pode ser observado para as ninfas de *A. griseus*.

Por outro lado, (*E*)-4-oxo-2-decenal não é produzido pelas ninfas de primeiro instar de *P. macunaima* e *P. stictica*, ainda que os dados apresentados sugiram que a composição da secreção das DAGs deste instar difere significativamente das dos demais ínstaros. Esta diferença se dá, principalmente, pela quantidade relativa de outros dois oxo-alcenais, (*E*)-4-oxo-2-hexenal (**b**) e (*E*)-4-oxo-2-octenal (**e**). Entretanto, bioensaios ainda precisam ser

realizados para testar se estes compostos atuam ou não no comportamento de agregação das ninfas de primeiro instar destas espécies.

Segundo Aldrich et al.,⁴² os ésteres são produzidos nas glândulas laterais da MTG e liberados para o reservatório para armazenamento onde são convertidos a aldeídos através de hidrólise enzimática seguida de oxidação, justificando o aparecimento deste grupo apenas na mistura feromonal de insetos adultos. Ainda que encontrados em menor concentração do que aldeídos e hidrocarbonetos, os ésteres também têm mostrado importante função biológica como feromônio de alarme, como descrito para a espécie *N. viridula*.⁵⁹

A similaridade entre ninfas e adultos já havia sido explicada por Carayon⁶², o qual afirmou que a glândula metatorácica de adultos de Heteroptera é morfologicamente e funcionalmente análoga ao terceiro par de glândulas abdominais dorsais das ninfas.

Entretanto, este é o primeiro trabalho relacionando a idade do inseto adulto à composição da mistura feromonal em percevejos. Foi possível observar diferenças quantitativas na composição do feromônio de alarme, entre as diferentes idades adultas estudadas, provavelmente relacionadas ao amadurecimento do organismo destes insetos. Isto porque, segundo estudos realizados em nosso laboratório (dados ainda não publicados), estes insetos ainda não são sexualmente maduros com 10 dias de idade adulta e as principais diferenças estão entre essa idade em relação às demais (20 e 30 dias).

Além dos compostos de defesa, feromônios sexuais podem também ser produzidos e libertados por MTG de determinados Heteroptera,¹¹ provavelmente a partir das glândulas laterais ligadas ao reservatório da MTG.⁶³⁻⁶⁵ OS feromônios sexuais derivados da MTG podem ser produzidos pelos machos, como em alguns Lygaeidae e Alydidae,^{63-64, 66} e pelas fêmeas, como em alguns Miridae e Alydidae.^{65, 67-71} Recentemente foi descrito que machos de *Phthia picta* produzem um feromônio sexual específico nas glândulas laterais da MTG.⁷² No entanto, nenhuma diferença foi observada entre as secreções da MTG de machos e fêmeas

das três espécies alvo deste estudo. Dessa forma, decidimos usar o método de aeração³ para estudar feromônios sexuais destas espécies, que será descrito no capítulo II.

**CAPITULO II - IDENTIFICAÇÃO E SÍNTESE DOS FEROMÔNIOS SEXUAIS DAS
ESPÉCIES *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* E *Agroecus griseus* (Heteroptera:
Pentatomidae)**

RESUMO

Os percevejos são uma das principais pragas agrícolas do mundo e vem se tornando cada vez mais problemático com o aumento de cultivares geneticamente modificados. Visando a identificação do feromônio sexual de *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*, os voláteis emitidos por insetos adultos, machos e fêmeas, foram coletados por meio de técnicas de aeração. Na comparação da análise por CG dos extratos foi possível observar a presença de um composto macho-específico em cada espécie. Bioensaios realizados com olfatômetro em Y e eletroantenografia mostrou a atividade biológica destes compostos macho-específicos apenas para as fêmeas coespecíficas. Análises de CG-EM e CG-IVTF dos compostos naturais e seus derivados sugeriram uma cetona com ramificações metílicas na cadeia carbônica como estrutura química do composto macho-específico de *P. macunaima* e um álcool com ramificações metílicas para *P. stictica*. Após a síntese de três diferentes estruturas propostas para cada composto natural, estas moléculas foram identificadas como 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona e 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol, respectivamente. Bioensaios com olfatômetro em Y demonstraram que as fêmeas de *P. macunaima* são atraídas para a cetona sintética, tornando-se possível confirmar a atividade biológica deste composto. Para *P. stictica*, a atividade biológica do álcool sintético ainda será verificada. As análises dos espectros de massas e infravermelho do composto macho-específico de *A. griseus*, levou à identificação do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, um componente previamente identificado do feromônio sexual de *Euschistus heros* e *E. obscurus*. Bioensaios com olfatômetro em Y mostraram que o padrão sintético foi fortemente atrativo para as fêmeas de *A. griseus*, e testes com CG-EAG provocaram respostas das antenas das fêmeas, tal qual o feromônio natural.

ABSTRACT

Stink bugs are one of the main agricultural pests in the world, and they have become increasingly problematic with the advent of genetically modified crops. Aiming the identification of the *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* and *Agroecus griseus* sex pheromone, the volatiles released by males and females adults were collected by aeration techniques. The GC analysis comparison of the males and females extracts made it possible to observe the presence of a male-specific compound for each species. Bioassays performed with Y-Tube olfactometer and electroantennograms showed the biological activity of these male-specific compounds only for females. GC-MS and GC-FTIR analysis of the natural compound and its derivatives, suggested a methyl branched ketone as the *P. macunaima* male-specific compound, and a methyl branched alcohol for *P. stictica*. After the synthesis of three different proposed structures for each natural compound, these molecules were identified as 2,4,8,13-tetramethyltetradecan-1-ol and 6,10,13-trimethyltetradecan-2-one. Y-tube olfactometer showed that *P. macunaima* females are attracted to the synthetic ketone, making it possible to confirm the biological activity of this compound. To the *P. stictica*, the biological activity still needs to be verified. The mass spectrum and infrared data of the *A. griseus* male-specific compound matched with methyl 2,6,10-trimethyltridecanoate, a sex pheromone component previously detected in the stink bugs *Euschistus heros* and *E. obscurus*. Y-tube olfactometer assays showed that the synthetic standard was strongly attractive to females, and GC-EAD tests produced similar responses with female antennae, as did the natural pheromone.

2.1. INTRODUÇÃO

Além dos compostos defensivos, os percevejos produzem voláteis, sexo-específicos, que tem a função de atrair o sexo oposto para o acasalamento (feromônio sexual, Figura 32) ou que servem para agregar vários insetos coespecíficos (quando é encontrado um novo sítio de alimentação, por exemplo), atraindo não só o sexo oposto, mas as ninfas e indivíduos do mesmo sexo (feromônio de agregação).



Figura 32. Percevejos acasalando. (Foto: Carla Fávaro)

Cerca de 30 espécies da família Pentatomidae já tiveram seus feromônios sexuais ou de agregação identificados.⁵⁷ Entre elas estão os principais percevejos pragas do Brasil, *Euschistus heros*³⁰⁻³¹, *Nezara viridula*³⁴, *Edessa meditabunda*¹² e *Piezodorus guildinii*^{27, 36}.

Dos feromônios sexuais identificados até agora em Pentatomidae não houve um padrão estrutural dos compostos de acordo com famílias ou subfamílias, no entanto, em todos os estudos, são os machos os responsáveis pela produção do feromônio sexual.²⁷

Entre os compostos sexuais identificados para percevejos, é possível encontrar hidrocarbonetos saturados (*Phthia picta*⁷²), terpenos (*Piezodorus hybneri*⁷³ e *N. viridula*³⁴], e ésteres metílicos (*E. heros*,³⁰⁻³¹ e *E. meditabunda*¹²), entre outros (Figura 33). Entretanto, em nível de gênero é possível observar um padrão estrutural para os feromônios. Como pode ser visto em *Euschistus*, que é o gênero com maior número de espécies com feromônio de agregação identificado (sete espécies), todas as espécies produzem o (*E,Z*)-2,4-decadienoato de metila como componente do feromônio.^{30, 74-76}

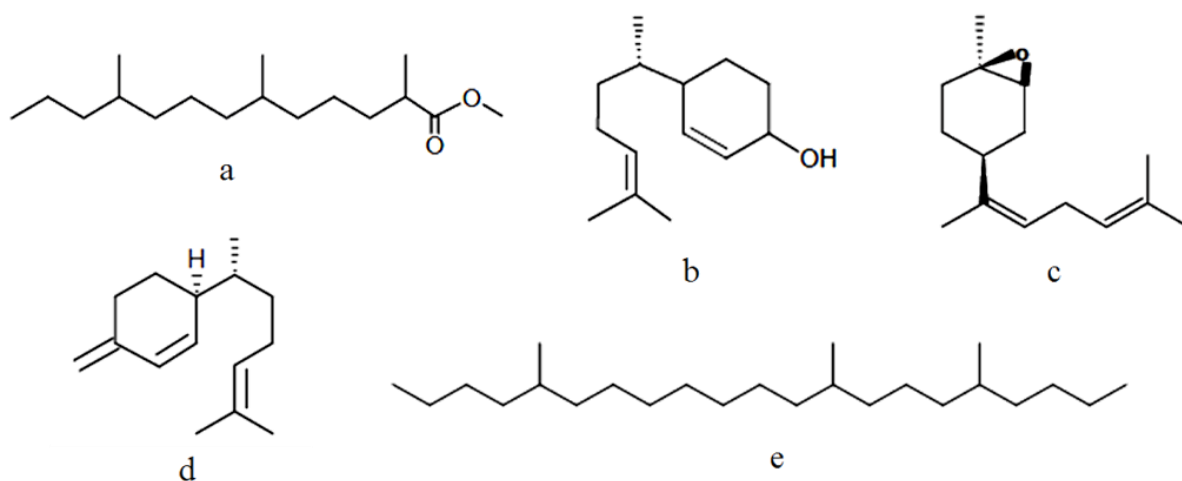


Figura 33. Exemplos de estruturas químicas dos feromônios sexuais ou de agregação identificados até agora em Pentatomidae. a) *Euschistus heros*³⁰⁻³¹; b) *Tibraca limbativentris*³⁷; c) *Nezara viridula*³⁴; d) *Piezodorus hybneri*⁷³ e e) *Phthia picta*⁷².

Mesmo com o grande número de feromônios identificados, ainda é pouco conhecida a função dos componentes na mistura feromonal. Geralmente, o composto sexo-específico majoritário tem sua atratividade comprovada em testes laboratoriais.^{24, 73, 77} No entanto, a

função dos componentes minoritários é desconhecida, pois não provocam o aumento da atratividade, nem provocam repelência.^{12, 78}

Diferentemente dos compostos defensivos, que são produzidos em glândulas grandes e de fácil extração, os feromônios sexuais de percevejos são produzidos em aglomerados de glândulas unicelulares, de difícil dissecação e extração.¹¹ Dessa forma, a metodologia mais adequada para estudar estes compostos é através da coleta de voláteis produzidos pelos insetos vivos.³

2.2. Objetivos específicos

- 1) Coletar os voláteis de adultos machos e fêmeas das três espécies,
- 2) Identificar os voláteis coletados, focando os compostos químicos sexo-específicos, que podem ser componentes dos feromônios sexuais,
- 3) Quantificar e sintetizar estes compostos sexo-específicos,
- 4) Realizar testes laboratoriais para avaliar o potencial dessas moléculas sintéticas.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Insetos

A obtenção e a manutenção em laboratório dos insetos utilizados nos experimentos deste capítulo seguiram os mesmos procedimentos adotados no capítulo 1 (Página 31).

2.3.2. Coleta de voláteis

Os voláteis foram coletados pelo método de aeração,³ no qual grupos de cinco indivíduos separados por sexo (Figura 34) foram colocados em câmaras de vidro (25 x 9 cm DI) contendo frutos de ligustro. Durante a coleta dos voláteis, os insetos foram mantidos na mesma temperatura e fotoperíodo que a colônia (Figura 35A). Um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado (1L/min) foi passado pelas câmaras, carregando todos os voláteis liberados pelos insetos, sendo, então, retidos em 50 mg de polímero adsorvente Super Q (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) localizados em colunas de vidro conectadas às câmaras (Figura 35B).

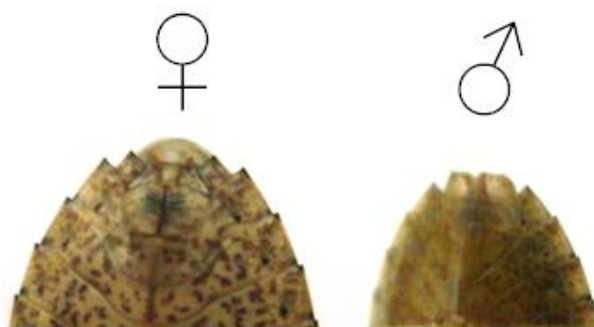


Figura 34. Aspecto dos últimos tergitos abdominais e componentes visíveis da genitália de machos e fêmeas, utilizados como critério para sexagem de *Pallantia macunaima*.

Após 24 h do início da aeração, os compostos retidos no polímero foram eluídos com 2 mL de hexano bidestilado e o extrato foi concentrado com um leve fluxo de ar filtrado, atingindo a concentração de 50 μ L (10 μ L por inseto, Figura 35C). Os extratos foram armazenados em freezer a -20°C para posteriores análises químicas e bioensaios.

Para a avaliação da dinâmica de emissão de feromônio, foram feitas extrações dos voláteis de cinco machos através da técnica de aeração. Os voláteis foram coletados a cada 12 h de fotofase e 12 h de escotofase ($n = 3$), e tridecano (50 ng) foi utilizado como padrão interno.



Figura 35. A) Câmaras de aeração para coleta de voláteis, B) colunas contendo o polímero adsorvente e C) eluição dos compostos retidos no polímero para obtenção do extrato. (Fotos: Carla Fávaro)

2.3.3. Análises químicas

Os extratos foram analisados (1 µL de extrato) pelas técnicas de CG, CG-EM e CG-IVTF utilizando os mesmos equipamentos e metodologias descritas capítulo 1 (página 34).

Análises de cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG-EAG) foram adquiridas por um cromatógrafo Shimadzu GC2010 acoplado a um detector eletroantenográfico Syntech® (Hilversum, Netherlands). O CG estava equipado com uma coluna capilar RTX-5 (30 mm x 0.25 mm x 0.25µm), operado em modo splitless (250°C) e com programa de temperatura começando em 100°C (1 min) e aumentando 7°C/ min até to 250°C. O efluente da coluna foi dividido em uma razão 1:1 com uma parte indo para o detector de ionização em chama (FID), a uma temperatura de 270°C, e a outra parte indo para a linha de transferência aquecida e com uma corrente de ar umidificado (300 mL/min), levando o fluxo diretamente para a antena. A antena era fixada entre dois eletrodos de aço inox usando gel condutivo (Signa gel, Parker Labs., EUA; Figura 36). Foram testadas antenas de adultos machos e fêmeas de cada espécie. As imagens geradas do sistema de eletroantenografia acoplado ao cromatógrafo em fase gasosa foram visualizadas com o programa Syntech GC-EAD32 (versão 4.6).

As análises de RMN de ^1H e de ^{13}C foram realizadas em um espectrômetro Bruker ARX-200® (DQ-UFPR, 200 e 50 MHz respectivamente) e em um Varian INOVA-400 (University of California – Riverside, 400 e 100.5 MHz, respectivamente), utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

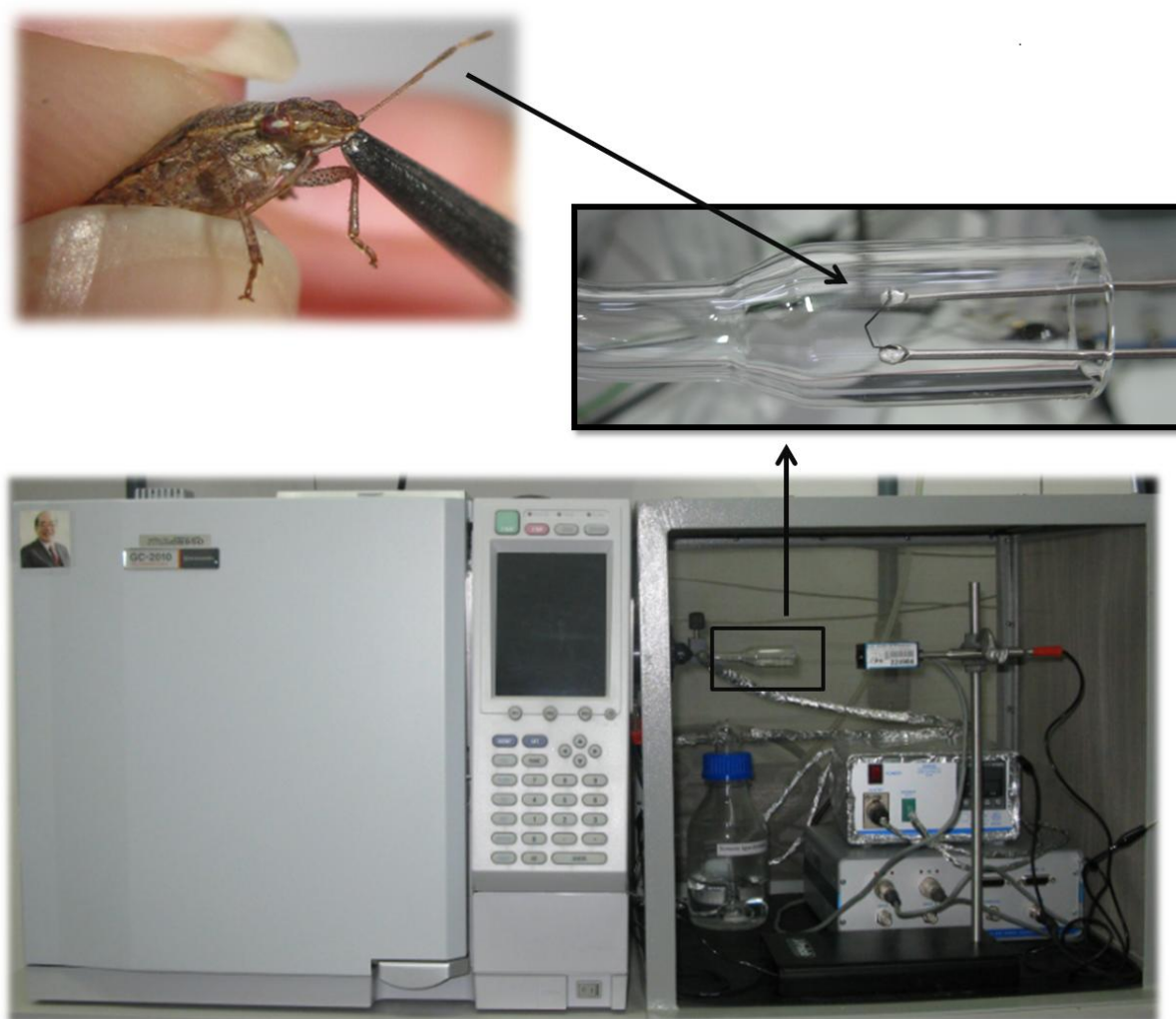


Figura 36. Processo de fixação de uma antena de *Pallantia macunaima* em eletrodos de um eletroantenógrafo.

2.3.4. Microderivatizações

2.3.4.1. Redução com hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4) ou deutereto de lítio e alumínio (LiAlD_4)⁴⁷

O extrato (50 μL) foi tratado com 5 μL de uma solução de LiAlH_4 ou LiAlD_4 em éter seco durante aproximadamente 1 minuto.

Então foi adicionado água e o produto foi extraído com éter. A solução etérea foi lavada com solução saturada de NaCl e seca com Na_2SO_4 anidro.

2.3.4.2. Reação com cloreto de trimetilsilano (TMSCl)⁴⁷

Misturou-se o reagente (1 μL) com o extrato (30 μL), elevou-se a temperatura em cerca de 80°C por 15 a 90 min e evaporou-se o excesso de reagente com fluxo de argônio. O resíduo foi dissolvido em diclorometano para análise em CG-EM.

2.3.4.3. Obtenção do esqueleto básico de carbono a partir de álcool⁴⁷

Os alcoóis foram convertidos a mesilatos por tratamento do extrato (50 μL) com solução de cloreto de metanossulfonila 1% em piridina (50 μL). Após 24h de reação, o excesso foi tratado com metanol e o solvente foi evaporado com fluxo de argônio. O resíduo foi dissolvido em éter e reduzido com LiAlH_4 em éter seco por 5 min (subtópico 3.4.1).

2.3.4.4. Obtenção do esqueleto básico de carbono a partir de cetona⁷⁹

O extrato contendo a cetona natural (100 µL) foi concentrado e adicionado a uma solução de ~ 0,5 mg de tosilhidrazina em 500 µL de metanol. A mistura foi aquecida a 40°C por 48h. Logo após, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente (~ 25°C) e o solvente foi removido. O resíduo foi dissolvido em éter e reduzido com 10 µL da solução de LiAlH₄ em éter seco, por 5 min (subtópico 3.4.1).

2.3.4.5. Oxidação com Reagente de Jones⁴⁷

O extrato foi dissolvido em acetona (100µL) e tratado com Reagente de Jones* (10µL). Após 30 min à temperatura ambiente, solução aquosa de bissulfito de sódio foi adicionada e o produto foi extraído com éter.

*Preparação do Reagente de Jones: solubilizou-se 5 g de CrO₃ em 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Adicionou-se com cuidado esta solução em 15 mL de água.⁸⁰

2.3.4.6. Esterificação com diazometano (CH₂N₂)⁴⁷

Este reagente foi preparado através de uma solução de hidróxido de potássio (0,4g) em etanol (10 mL) que foi colocada em um balão de destilação, ao qual se adaptou um funil de separação e um condensador, sendo todo o aparato sem junta esmerilhada. Dissolveu-se *p*-toluilsulfonilmetil-nitrosamida (Diazald®) (2,14g) em éter etílico (30 mL), resfriou-se em banho de gelo e após 5 min colocou-se no funil de separação. O balão de destilação foi

aquecido em banho-maria a 60°C. A solução etérea foi gotejada lentamente sobre a solução alcoólica. A solução etérea de diazometano obtida apresentou cor amarela característica.⁸¹

A solução de diazometano em éter foi adicionada à solução dos ácidos graxos produtos das derivatizações, em uma proporção de 1:1 (subtópico 3.6.5), sendo agitado levemente e a solução de diazometano em excesso foi evaporada com leve fluxo de argônio.

2.3.4.7. Hidrogenação⁴⁷

A reação foi realizada com a mistura de uma pequena quantidade de amostra (50 uL) e ~ 0,5 mg de Pd/C (10%) como catalisador. Um balão cheio de H₂ foi conectado ao vidro que continha a mistura e a reação foi mantida de 8 a 10 h. A amostra reduzida foi filtrada e uma pequena alíquota foi analisada por CG-EM.

2.3.5. Bioensaios com olfatômetros de dupla-escolha

A resposta comportamental dos insetos adultos, machos e fêmeas, para os extratos contendo os compostos sexo-específicos e para os compostos sintéticos foi verificada em um olfatômetro em Y, utilizando fluxo de ar contínuo de 2.5 L/min previamente umidificado e filtrado com carvão ativado. O olfatômetro consiste de um tubo de vidro de 4 cm de diâmetro em forma de Y, com o tubo principal com 40 cm de comprimento e dois braços menores de 20 cm comprimento cada (Figura 37).

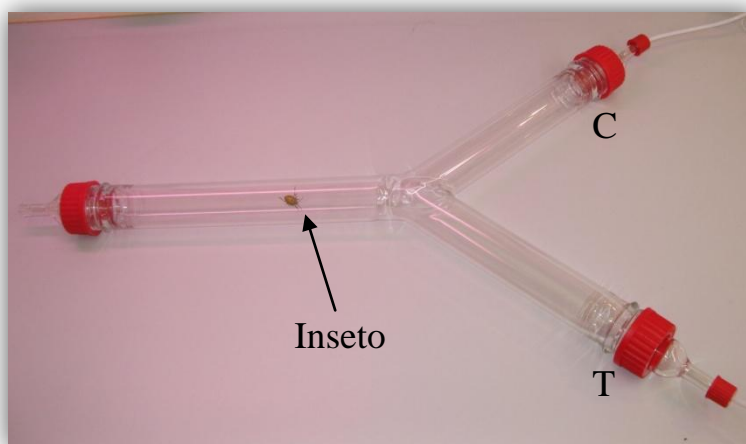


Figura 37. Olfatômetro em Y utilizados em bioensaios. C: controle, T: tratamento.

Na extremidade de cada braço do olfatômetro foi colocado uma fonte de odor que consistia em um pedaço de papel filtro (2 x 2 cm) impregnado com uma solução do tratamento (extratos dos voláteis dos insetos ou compostos sintéticos) ou com controle (extrato dos voláteis da planta ou hexano). Um inseto foi introduzido na base do tubo principal do olfatômetro e seu comportamento foi observado durante 20 min. Foi considerado “resposta” quando o inseto caminhava contra o fluxo de ar em direção à fonte de odor, avançava por mais de 5 cm em algum dos braços e permanecia por mais de 2 min no braço escolhido. Foi considerado como “não resposta” quando o inseto não saía do tubo principal. Após observar 5 insetos, o olfatômetro era lavado com álcool e um fluxo de ar limpo era passado por 5 min, sendo a posição dos braços do olfatômetro invertida para evitar qualquer interferência externa. A fonte de odor era renovada a cada experimento. Os experimentos foram conduzidos no final da tarde⁷⁷ e cada inseto foi testado uma vez.

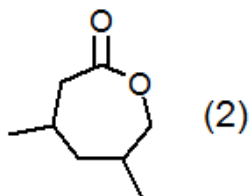
2.3.6. Estatísticas

As respostas dos machos e fêmeas ao composto sintético macho-específico foram analisadas pelo teste Qui-Quadrado. Os dados referentes à dinâmica de emissão de feromônio foram avaliados por ANOVA seguida pelo teste Tukey. Todas as análises foram feitas usando o programa BioEstat versão 5.0.⁴⁸

2.3.7. Sínteses

2.3.7.1. Síntese do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (9).

2.3.7.1.1. Síntese do 4,6-,dimetiloxepan-2-ona (2).⁸²



A uma solução em agitação de 3,5-dimetil-ciclohexanona (**1**) (5,54 g; 43,97 mmol) em diclorometano (CH_2Cl_2 , 120 mL) a 0°C, foi adicionado ácido *m*-cloroperbenzóico (11,37 g; 43,97 mmol) e ácido trifluoroacético (0,23 mL; 4,40 mmol). A reação em agitação foi mantida a 0°C por 1 h sendo, então, resfriada a temperatura ambiente e mantida por 24 h. Após 24 h, a mistura foi resfriada a aproximadamente 4°C, mantida em agitação por mais 20 min, filtrada por sucção e o sólido restante foi lavado com hexano. O filtrado foi agitado com solução aquosa de bissulfito de sódio (75 mL) por quatro horas. Após a separação das fases, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e de cloreto

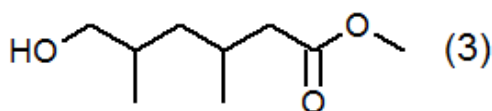
de sódio (NaCl), seca com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto **2** foi obtido com 96% de rendimento e utilizado para a próxima etapa sem purificação.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,93 (d, *J* = 6,97 Hz, 3H); 1,05 (d, *J* = 6,95 Hz, 3H); 1,62 – 2,07 (m, 4H); 2,43 – 2,59 (m, 2H); 3,85 – 4,10 (m, 2H) (Página 166).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 18,8; 24,1; 29,8; 34,0; 42,1; 46,8; 74,2; 174,9 (Página 166).

EM [70eV; *m/z* (%)]: 142 (4); 112 (74); 97 (41); 94 (34); 84 (11); 83 (20); 79 (7); 69 (100); 56 (37); 55 (38); 42 (38); 41 (45) (Página 165).

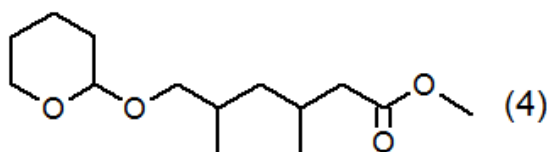
2.3.7.1.2. Síntese do 6-hidroxi-3,5-dimetilhexanoato de metila (**3**).



Em um balão de três bocas, acoplado a um condensador de refluxo contendo a solução da lactona **2** (6,19 g; 43,56 mmol) em metanol (125 mL), foram adicionadas duas gotas de ácido sulfúrico concentrado e refluxou-se o sistema por 15 min. Após o resfriamento, o metanol foi evaporado e o produto trabalhado com éter etílico. A solução etérea foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ e NaCl. A fase orgânica foi separada, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida, sendo o hidróxi-éster **3** obtido em rendimento quantitativo.

EM [70eV; *m/z* (%)]: 144 (14); 125 (8); 111 (8); 101 (100); 97 (10); 87 (10); 83 (60); 74 (27); 69 (42); 59 (24); 55 (46); 41 (25) (Página 167).

2.3.7.1.3. Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)hexanoato de metila (4).⁸³⁻⁸⁴



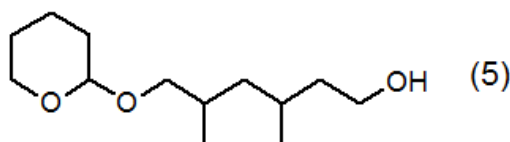
Em uma solução em agitação do álcool **3** (7,58 g; 43,56 mmol) em tetrahidrofurano (THF, 40 mL), foi adicionado alguns cristais de ácido *p*-toluenossulfônico (pTSA) e dihidropirano (DHP; 4,80 mL; 51,42 mmol). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 4 h e então lavada com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi separada, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto cru **4** (91%) foi utilizado na próxima etapa sem purificação.

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃, ppm): δ 0,78 – 2,45 (m, 18H); 3,03 – 3,38 (m, 2H); 3,38 – 4,20 (m, 2H); 3,65 (s, 3H); 4,48 – 5,34 (m, 1H) (Página 169).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃, ppm): δ 17,8; 19,5 (19,6; 19,7); 20,4; 25,4 (25,5); 27,9; 30,7 (30,8; 30,9); 31,6; 41,1; 41,3 (41,4); 51,3; 62,0 (62,2; 62,9); 72,7 (72,8); 94,6 (98,7; 99,1); 173,6 (Página 169).

EM [70eV; *m/z* (%)]: 196 (1); 173 (4); 157 (11); 143 (20); 125 (27); 115 (4); 101 (22); 85 (100), 67 (13); 55 (22); 41 (12) (Página 168).

2.3.7.1.4. Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)hexan-1-ol (5).⁸⁴



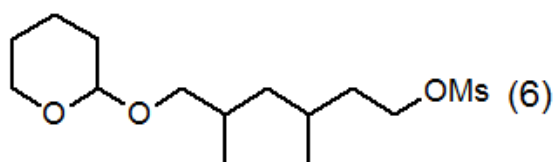
Uma solução do éster metílico **4** (10,06 g; 38,99 mmol) em THF seco (140 mL) foi adicionada devagar a uma suspensão de LiAlH_4 (2,22 g; 58,50 mmol) em agitação em THF seco, a 0°C e atmosfera de argônio. Quando a adição foi completada, o banho de gelo foi removido e a mistura ficou em agitação em temperatura ambiente. Após 20 h, a mistura foi resfriada a 0°C e a reação foi cuidadosamente terminada com água (2,50 mL) solução aquosa de hidróxido de sódio 15% (NaOH ; 2,50 mL) e água novamente (10 mL). Após ser agitada por 30 min, a mistura foi diluída em acetato de etila (EtOAc ; 200 mL), filtrada através de celite e concentrada sob pressão reduzida. O produto **5** foi obtido com 95% de rendimento.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,8 – 1,15 (m, 6H); 1,33 – 1,93 (m, 12H); 2,92 – 3,94 (m, 6H); 4,45 – 4,62 (m, 1H) (Página 171).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 18,0 (18,2); 19,7; 20,4; 25,5; 26,7; 27,0; 30,7 (30,9); 39,7 (39,8); 41,1 (41,6); 60,7 (60,9); 62,4 (62,5); 72,5 (73,1); 99,1 (99,2) (Página 171).

EM [70eV; m/z (%]): 200 (1); 172 (1); 157 (1); 145 (2); 129 (6); 111 (15); 95 (2); 85 (100); 69 (45); 55 (27); 41 (19) (Página 170).

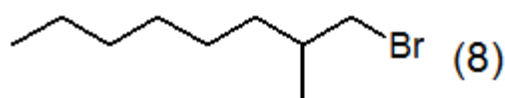
2.3.7.1.5. Síntese do metanossulfonato de 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexila (6)⁸²



À uma solução do álcool **5** (0,75 g; 3,26 mmol) em CH_2Cl_2 (6 mL) à -10°C , foi adicionada piridina (3,39 mL; 4,89 mmol) e manteve-se em agitação por 5 min. A esta mistura, foi adicionada gota-a-gota uma solução de cloreto de mesila (0,28 mL; 3,57 mmol)

em CH_2Cl_2 (2 mL). Após 4 h de reação, A solução foi lavada com água, solução saturada de NaHCO_3 , solução aquosa de sulfato de cobre, solução saturada de NaCl , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O mesilato **6** foi obtido em 91% de rendimento após purificação por coluna cromatográfica utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (8:2).

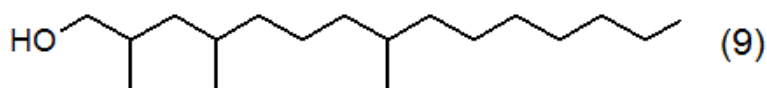
2.3.7.1.6. Síntese do 1-bromo-2-metilnonano (**8**)⁸⁴⁻⁸⁵



A uma solução de 2-metilnonan-1-ol (**7**) (0,72 g; 4,53 mmol) e tetrabrometo de carbono (1,80 g ; 5,42 mmol) em CH_2Cl_2 (40 mL), em agitação e à 0°C, foi adicionada uma solução de trifenilfosfina (Ph_3P ; 1,78 g; 10,06 mmol) em CH_2Cl_2 (20 mL). A mistura reacional permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 1 h. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando hexano como fase móvel. O brometo **8** foi obtido em 97% de rendimento.

EM [70eV; m/z (%)]: 222 (0); 165 (1); 163 (1); 151 (14); 149 (14); 141 (3); 123 (2); 121 (2); 99(7) 85 (38); 71 (47); 57 (78); 41 (100) (Página 172).

2.3.7.1.7. Síntese do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**)^{82, 86}



Formação do reagente de Grignard: uma alíquota de 1 mL de uma solução de brometo **8** (3,04 mmol; 0,67 g) em 6 mL de éter etílico anidro foi adicionada a um balão contendo raspas de magnésio metálico (6 mmol; 0,14 g) em atmosfera de argônio. A mistura foi agitada até o início da reação de formação do reagente de Grignard e o restante da solução do brometo foi adicionada gota-a-gota por uma bomba de seringa em um período de aproximadamente 1 h. Após o término da adição, a mistura foi agitada por mais 1 h.

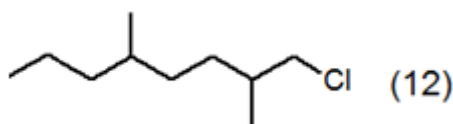
Uma solução do mesilato **6** (0,67 g; 2,17 mmol) em éter etílico seco (8 mL) foi mantida em agitação a -40°C por 5 min e atmosfera inerte. Solução de tetraclorocuprato de lítio (Li_2CuCl_4 ; 0,20 mL; 0,394 M em THF) foi adicionada gota-a-gota à solução do mesilato e a mistura foi mantida em agitação por mais 15 min. O reagente de Grignard foi adicionado gota-a-gota na mistura reacional, também com o auxílio da bomba de seringa. Após o término da adição, a reação foi mantida em agitação em temperatura entre -40 e -20°C por 1 h. A reação foi, então, finalizada com solução 1 M de ácido clorídrico e a mistura foi extraída em éter etílico. A fase etérea foi lavada com solução saturada de NaHCO_3 e de NaCl , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida.

O produto resultante foi colocado em metanol (5 mL) com alguns cristais de pTSA para desproteção. Após 2 h o metanol foi evaporado e o resíduo foi diluído em éter. A fase etérea foi lavada com solução saturada de NaHCO_3 e de NaCl , seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O álcool **9** foi purificado através de coluna cromatográfica utilizando como fase móvel hexano e obtido com 21% de rendimento (16% de rendimento total).

EM [70eV; m/z (%)]: 224 (1); 182 (2); 196 (2); 252 (2); 168 (5); 210 (5); 153 (5); 140 (15); 111 (27); 126 (28); 97 (37); 41 (40); 125 (50); 69 (55); 71 (61); 43 (65); 55 (75); 83 (96); 57 (100). (Página 122).

2.3.7.2. Síntese do 2,4,8,11-tetrametiltetradecan-1-ol (13).

2.3.7.2.1. Síntese do 1-cloro-2,5-dimetiloctano (12)

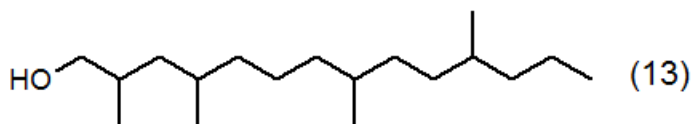


Para a síntese do cloreto **12**, foi utilizado mesmo procedimento descrito no item 3.10.1.7. O reagente de Grignard foi formado a partir do 1-bromo-2-metilpentano (**10**) (2 g; 12,11 mmol) e magnésio metálico (18,16 mmol; 0,44 g) em THF seco (25 mL). O reagente de Grignard foi adicionado lentamente à uma solução de 1-bromo-3-cloro-2-metilpropano (1,87 g; 10,90 mmol) e Li_2CuCl_4 (0,83 mL; 0,394 M em THF) em THF seco (40 mL). O produto foi obtido em 23% de rendimento.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,80 – 1,42 (m, 18H); 1,64 – 1,88 (m, 1H); 3,33 – 3,54 (m, 2H) (Página 173).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 14,6; 18,0; 20,3; 22,9; 31,6 (31,8); 32,9; 34,3; 36,1; 39,4 (39,6); 51,6 (Página 174).

2.3.7.2.2. Síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (13)

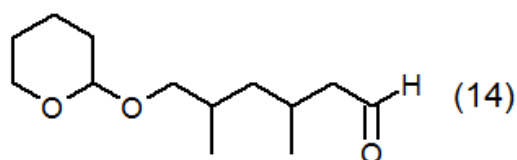


Foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item no item 3.10.1.7, empregando-se o cloreto **12** (0,23 g; 1,30 mmol) e magnésio metálico (0,09 g; 3,90 mmol) em THF (3 mL) para obtenção do reagente de Grignard. Entretanto, para o início da formação do reagente, foi

necessário o aquecimento do THF em 50°C e adição de bromoetano (0,07 mL; 1 mmol). O reagente de Grignard foi adicionado a uma solução do mesilato **6** (0,27 g; 0,87 mmol) e Li_2CuCl_4 (0,03 mL; 0,394 M em THF) em THF seco (4 mL). Para a desproteção, foram utilizadas as mesmas quantidades de metanol e pTSA descritas anteriormente. O produto final **13** foi obtido em 6% de rendimento nesta reação e com 4% de rendimento global.

2.3.7.3. Síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

2.3.7.3.1. Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)hexanal (**14**)⁸⁷

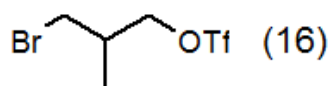


Uma solução do álcool **5** (0,69 g; 3 mmol) em CH_2Cl_2 seco (3 mL) foi adicionada a uma solução em agitação e a 0°C de dicromato de piridina (PDC; 2,24 g; 6 mmol) em CH_2Cl_2 seco (20 mL), contendo peneira molecular 3Å (mesma massa de PDC). A mistura foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 2 h e então filtrada em carvão ativado e sílica. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o produto foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila (9:1), sendo obtido em 86% de rendimento.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 1,35 – 1,88 (m, 16H); 2,01 – 2,44 (m, 2H); 3,07 – 3,95 (m, 4H); 4,52 – 5,00 (m, 1H); 9,75 (t, $J = 2,15\text{Hz}$, 1H) (Página 175).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 14,3; 18,0; 19,8 (20,6; 20,9; 22,8); 25,7 (26,0); 27,9; 30,9 (31,1); 31,8; 41,5 (41,5; 41,6); 51,0; 62,3 (62,4; 63,1); 72,9 (73,0); 99,1 (99,3); 203,2 (Página 176).

2.3.7.3.2. *Síntese do trifluorometonossulfonato de 3-bromo-2-metilpropila (16)*⁸⁸

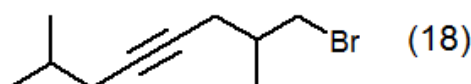


A uma solução resfriada (-15°C) de 3-bromo-2-metilpropan-1-ol (14) (1 g; 6,54 mmol) em CH_2Cl_2 (25 mL) foi adicionada piridina (0,53 mL; 6,54 mmol) seguida de anidrido trifílico (1,32 mL; 7,84 mmol). A reação ficou em agitação por 1 h a 0°C e, então, foi diluída em pentano (50 mL) e filtrada em celite. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida (0,1 mmHg, 30 min). O triflato 15 foi obtido em rendimento quantitativo e utilizado para a próxima etapa sem necessidade de purificação.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,89 – 1,36 (m, 3H); 2,30 – 2,41 (m, 1H); 3,31 – 3,58 (m, 2H); 4,53 (d, $J = 5,47\text{Hz}$, 2H) (Página 177).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 15,3; 22,6; 34,6 (35,3); 78,5; 117,2 (120,4) (Página 178).

2.3.7.3.3. *Síntese do 1-bromo-2,7-dimetil-4-octino (18)*⁸⁸

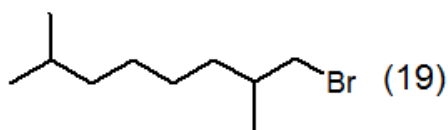


n-Butillítio (n-BuLi; 4,49 mL; 2,2 M em hexano) foi adicionado a uma solução de 4-metil-1-pentino (**17**) em THF seco (30 mL), resfriada a -78°C e em agitação. A temperatura foi elevada a 0°C , a solução permaneceu em agitação por 15 min e foi resfriada novamente a -78°C . Então, uma solução do triflato **16** (1,86 g; 6,54 mmol) em THF seco (13 mL) foi adicionada lentamente na solução de 4-metil-1-pentinil-lítio. A mistura permaneceu em agitação por 1 h e, então, foi aquecida à temperatura ambiente e extraída em éter. A fase etérea foi lavada com solução saturada de cloreto de amônio (NH_4Cl) e de NaCl, e o produto foi concentrado sob pressão reduzida. O produto **18** foi purificado por coluna cromatográfica e hexano como fase móvel, sendo obtido com 93% de rendimento.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,86 (t, $J = 7,22\text{Hz}$, 3H); 0,94 (d, $J = 6,64\text{Hz}$, 3H), 1,06 – 1,09 (m, 3H); 1,16 – 1,37 (m, 1H); 1,69 – 2,01 (m, 1H); 1,91 – 2,05 (m, 2H); 2,26 (dt, $J_1 = 6,25\text{Hz}$; $J_2 = 6,24\text{ Hz}$, 2H); 3,39 – 3,52 (m, 2H) (Página 179).

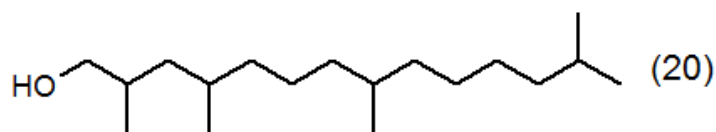
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 14,3; 18,6; 22,1; 22,6; 24,6; 28,1 (28,4); 34,3 (35,4); 39,8; 78,0; 81,3 (Página 180).

2.3.7.3.4. Síntese do 1-bromo-2,7-dimetiloctano (**19**)⁸⁹



Uma solução do alcino **18** (9,21 mmol, 2 g) em 20 mL de hexano, contendo uma suspensão de paládio/carbono (Pd/C, 5%) (0,25 g), foi agitada e borbulhado hidrogênio por 4 horas. Após este tempo, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto **19** foi obtido com 87% de rendimento.

2.3.7.3.5. Síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (20)⁹⁰



O sal de fosfônio foi obtido a partir do aquecimento do brometo **19** (0,37 g; 1,67 mmol) e Ph_3P (0,438 g; 1,67 mmol) em uma ampola selada por 24 horas à 90°C em estufa. O produto sólido foi seco a temperatura ambiente sob pressão reduzida até peso constante.

Uma suspensão do sal de fosfônio em 5mL de THF seco foi agitada a temperatura ambiente por 20min. Em seguida, a mistura foi resfriada a -78°C em banho de acetona e gelo-seco, e n-butilítio foi adicionado lentamente até a mistura ficar avermelhada. Então, o n-butilítio necessário para a reação (0,75 mL; 2,20 M) foi lentamente adicionado na mistura. A temperatura da solução foi elevada para a 0°C de forma gradual e mantida sobre agitação por 30min. Após esse período a solução foi novamente resfriado a -78°C e o aldeído **14** (0,361 g; 1,56mmol) em 2mL de THF seco foi adicionado. O banho foi removido e a temperatura foi elevada à ambiente, sendo mantido por 12 horas. Após esse período, foi adicionado pequenas quantidades de uma solução saturada de NH_4Cl e a suspensão resultante foi agitada por mais 15min. O produto foi, então, extraído com hexano. A fase orgânica foi extraída com solução saturada de NaCl , seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica com fase móvel de hexano/acetato de etila (8:2) e submetido às etapas de desproteção (item 3.10.1.7) e hidrogenação (item 3.10.3.3) para formação do álcool 20 em 38% de rendimento. O rendimento total para esta rota sintética foi de 27%.

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 0,81 – 1,79 (m, 35H); 3,36 (dd, $J_1 = 10,35\text{Hz}$; $J_2 = 6,83\text{Hz}$, 1H); 3,51 (dd, $J_1 = 10,35\text{Hz}$, $J_2 = 5,27\text{Hz}$, 1H) (Página 181).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 14,3; 19,9; 22,9; 24,5; 27,6; 28,0; 28,2; 30,3; 31,8; 33,0; 33,4; 37,2; 37,3; 37,4; 37,6; 39,3; 68,6 (Página 182).

EM [70eV; m/z (%):(%)]: 182 (1); 196 (1); 224 (1); 252 (1); 168 (3); 153 (4); 210 (7); 140 (13); 126 (18); 111 (22); 97 (27); 125 (27); 41 (42); 69 (54); 71 (67); 43 (72); 55 (72); 83 (72); 57 (100). (Página 130).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. *Pallantia macunaima*



Figura 38. Exemplar de adulto da espécie *Pallantia macunaima*.

Os cromatogramas obtidos das análises dos voláteis de adultos machos e fêmeas da espécie *P. macunaima* (Figura 38) mostraram a presença de um composto produzido somente pelos machos, como pode ser observado na Figura 39. Os índices de Kovats para o composto macho-específico foram calculados em duas diferentes colunas cromatográficas, sendo que para a coluna com caráter pouco polar, a RTX-5, o valor obtido foi de 1753 e para a coluna de caráter polar, RTX-WAX, foi encontrado o valor de 1947.

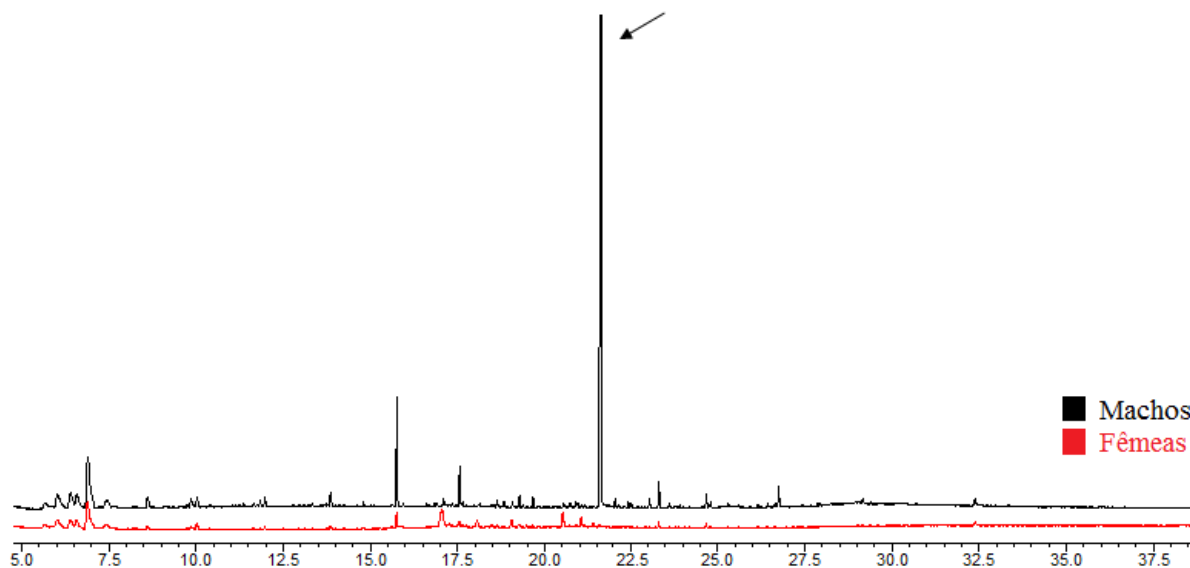


Figura 39. Comparação do cromatogramas obtidos das análises dos voláteis liberados por machos e fêmeas de *Pallantia macunaima*, mostrando o composto macho-específico.

Para saber se o extrato que continha o composto macho-específico apresentava atratividade sobre os indivíduos adultos desta espécie, foram realizados testes biológicos comportamentais utilizando olfatômetro em Y. Neste teste, os insetos tinham que escolher entre a fonte de odor que continha o extrato de macho com alimento (ligustro) e a fonte de odor com o extrato apenas de ligustro. Foram testadas 52 fêmeas, das quais 46 escolheram alguma fonte de odor. Dentre estas, 30 seguiram em direção ao extrato dos voláteis de macho, o que representou 65% do total. Também foram testados 10 machos, onde apenas 3 responderam e um inseto (33%) foi para a fonte de odor que continha os voláteis dos machos. Dessa forma, foi possível observar que o extrato dos voláteis de macho exerceu uma atratividade significativa apenas para as fêmeas, constatando assim que há a presença do feromônio sexual nos extratos dos voláteis de machos desta espécie. Os dados deste teste podem ser observados na Figura 40.

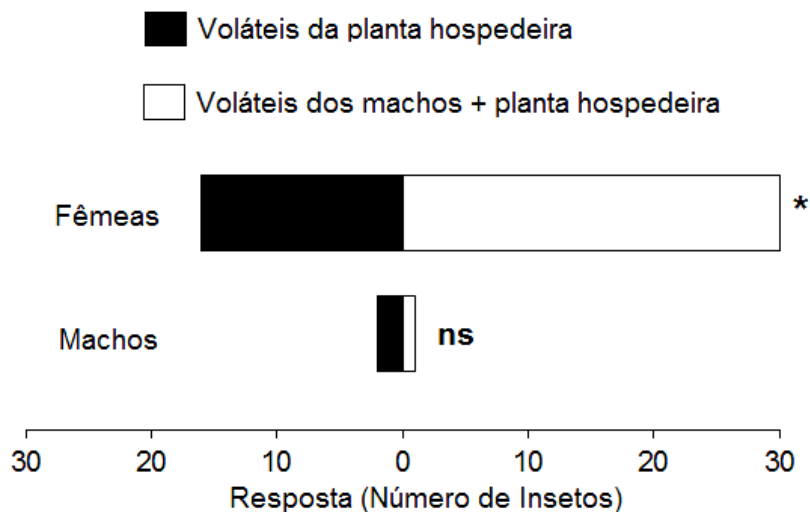


Figura 40. Respostas de machos e fêmeas *Pallantia macunaima* aos voláteis presentes nos extratos de macho + planta hospedeira vs. voláteis de planta hospedeira *Ligustrum lucidum* (Oleaceae). Os dados foram analisados com o teste Qui-quadrado ($P=0.003$).

Testes de eletrofisiologia utilizando-se o extrato da aeração dos machos com antenas de machos e fêmeas foram realizados para saber se o composto macho-específico, ou algum outro composto do extrato, apresentava atividade eletrofisiológica para os insetos desta espécie. Dos componentes do extrato, apenas o composto macho-específico provocou perturbação da antena (Figura 41). Este resultado indicou ser este composto o feromônio sexual de *P. macunaima*.

A liberação do composto macho-específico de *P. macunaima* ocorreu principalmente durante a fotofase. Embora também ocorresse a detecção deste composto durante a escotofase, aproximadamente 71% da emissão diária ocorreram durante as 12 h de luz (Figura 42).

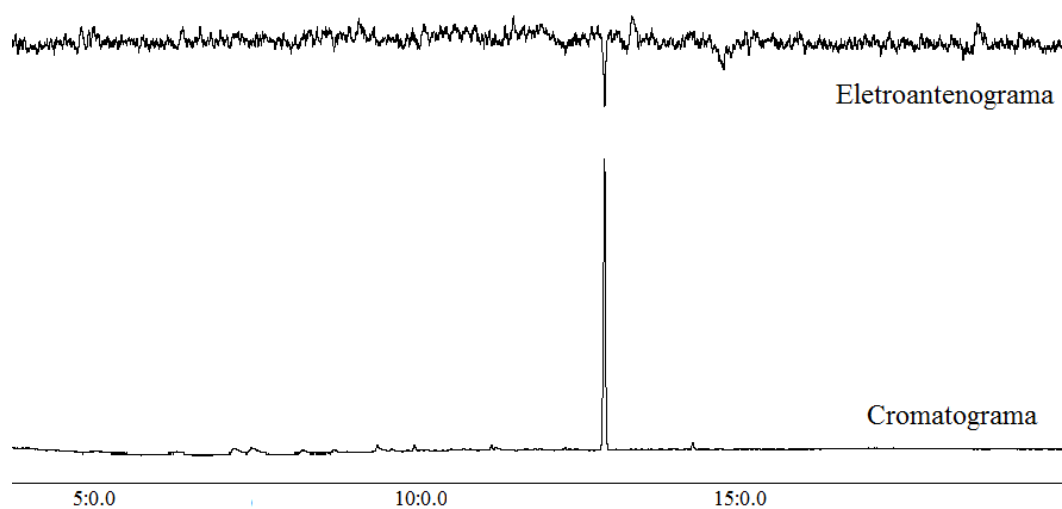


Figura 411. Perturbações de antena de fêmeas para extrato obtido da aeração dos voláteis de machos da espécie *Pallantia macunaima*.

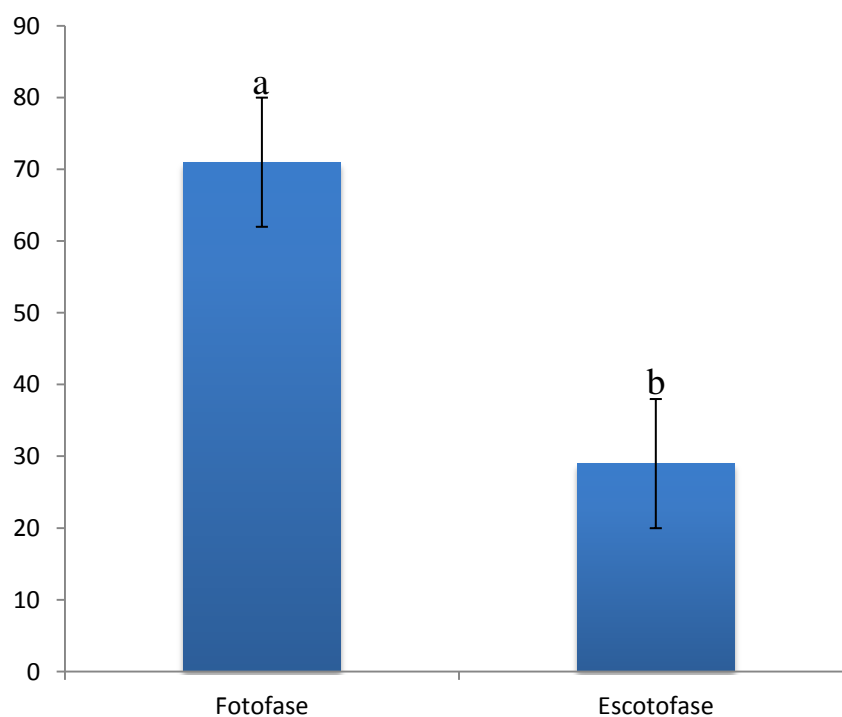


Figura 42. Porcentagem de feromônio sexual emitida por machos de *Pallantia macunaima* na fotofase e na escotofase. Colunas com letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,0001$) ($n = 6$).

Para a elucidação estrutural do possível feromônio sexual de *P. macunaima*, foram realizadas análises dos extratos por CG-IVTF (Figura 43) e CG-EM (Figura 44). No espectro de infravermelho podem ser observadas duas bandas em 1716 cm^{-1} e 1168 cm^{-1} , referentes aos estiramentos C=O e C-C-C e que juntas caracterizam a função cetona.

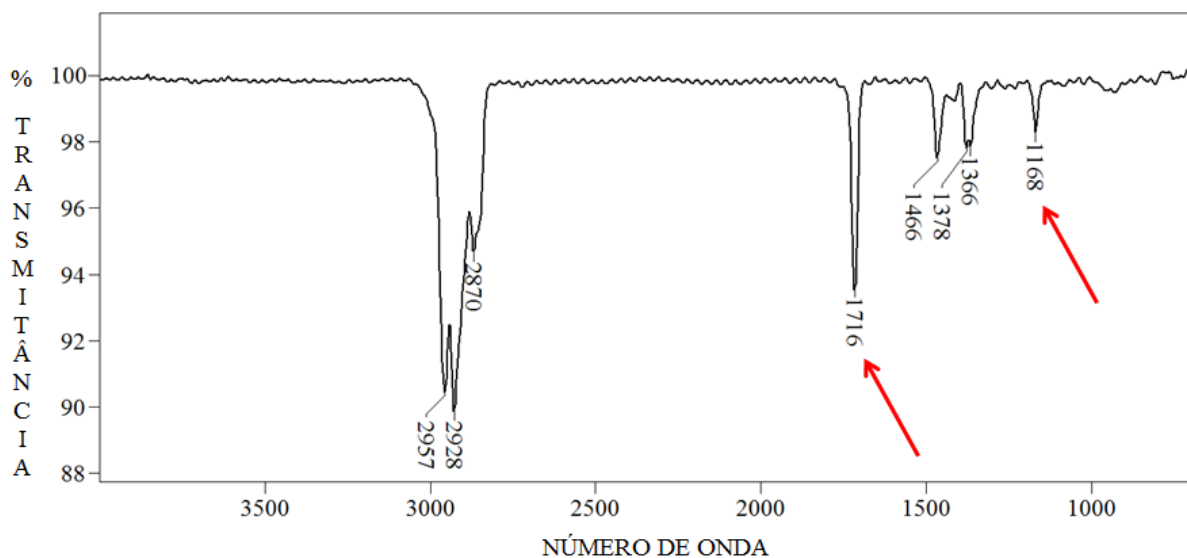


Figura 43. Espectro de infravermelho do composto macho-específico da espécie *Pallantia macunaima*.

Dentre os principais fragmentos encontrados no espectro de massas, destacam-se o do íon molecular em m/z 254 (M^+) e o m/z 236 ($M^+ - 18$) referente a perda de uma molécula de água. Os fragmentos m/z 109 e m/z 165, que se sobressaem aos fragmentos anteriores, sugerem a presença de duas ramificações, enquanto que o fragmento m/z 58, atribuído ao rearranjo de McLafferty⁵⁴ (Figura 45), sugere a presença de uma carbonila localizada no carbono 2 da cadeia principal.

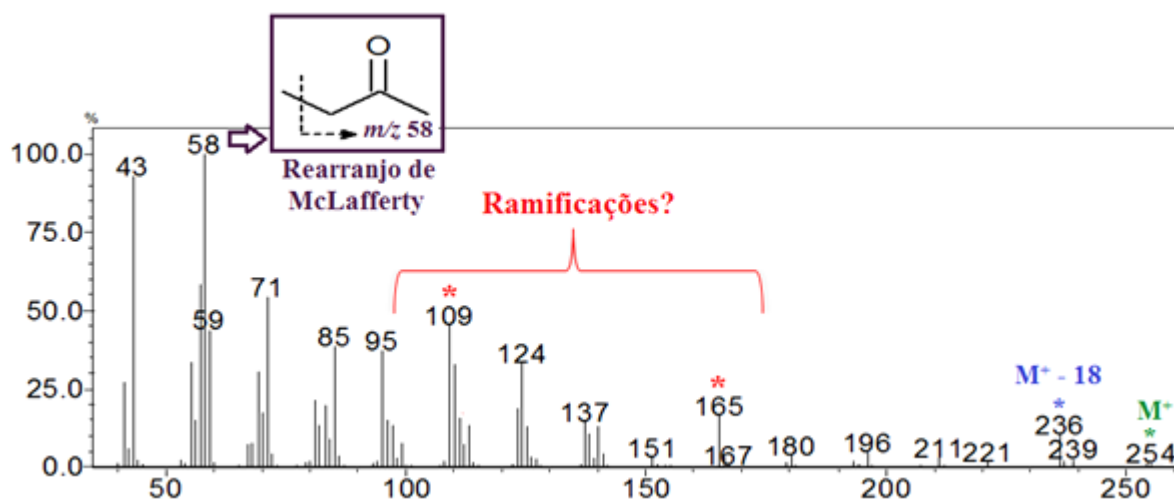


Figura 44. Espectro de massas do composto macho-específico produzido por *Pallantia macunaima*

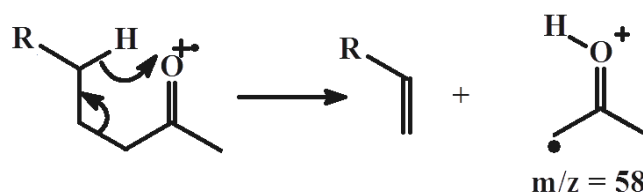


Figura 45. Rearranjo de McLafferty resultando no fragmento m/z 58.⁵⁴

Para auxiliar na identificação estrutural, foi realizada a hidrogenação catalítica da geranil acetona (6,10-dimetilundecan-2-ona) que apresentaria, teoricamente, um padrão estrutural análogo ao feromônio natural. O produto foi analisado por CG-EM (Figura 46), para fim de comparação do espectro de massas obtido com o composto natural, já que esta molécula também possui a carbonila no carbono 2 da cadeia principal e duas ramificações metilas. Como esperado, está presente como pico base o fragmento em m/z 58, referente ao rearranjo de MacLafferty⁵⁴, e o fragmento em m/z 180, devido à perda da molécula de água ($M^+ - 18$). Também foi possível observar a semelhança na intensidade dos fragmentos em m/z 113 e m/z 95 em comparação aos mesmos fragmentos no espectro de massas do composto

macho-específico, referente à possível ramificação do grupo metila localizada no carbono 6 da cadeia principal. Esta semelhança sugere que a estrutura química do composto natural também possui esta ramificação.

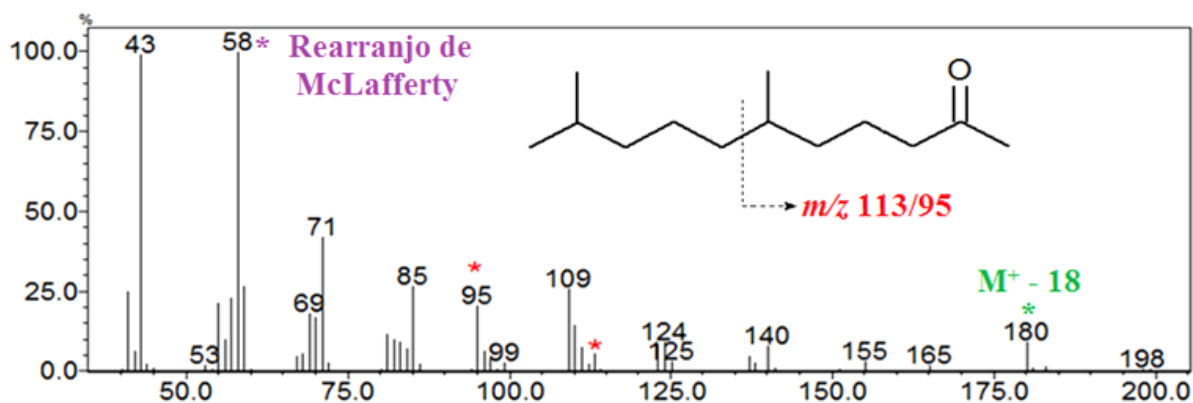


Figura 46. Espectro de massas do produto da hidrogenação da geranil acetona.

Com os fragmentos discutidos até aqui, somado ao fragmento m/z 165, que sugere a presença de uma segunda metila como ramificação no carbono 10, foi atribuída como sendo a estrutura química do composto macho-específico produzido por *P. macunaima* a 6,10-dimetilpentadecan-2-ona (Figura 47).

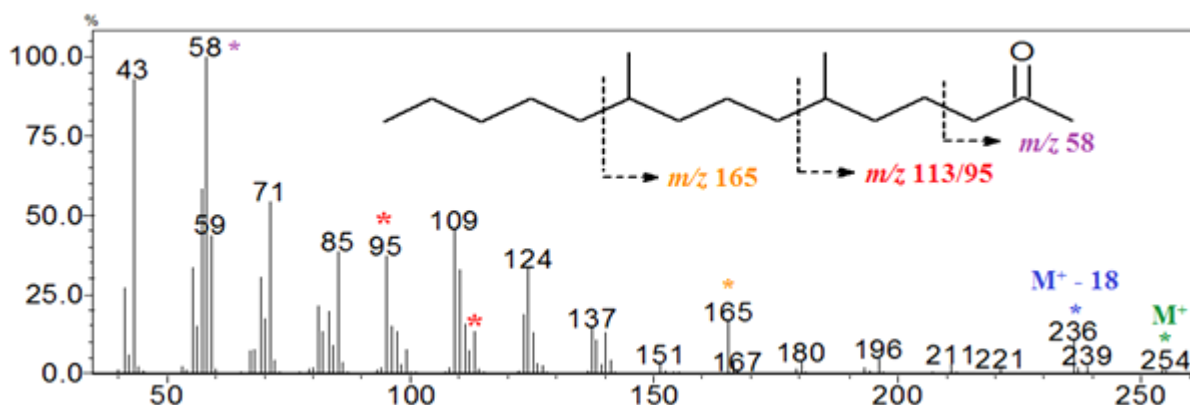


Figura 47. Espectro de massas e possível estrutura atribuída ao composto macho-específico da espécie *Pallantia macunaima*.

O extrato foi submetido às micro-reações de redução com LiAlH_4 e sililação com TMSCl , para confirmação da estrutura atribuída. O espectro de massas obtido na redução do extrato pode ser visto na Figura 48. Com o surgimento do fragmento m/z 45 em substituição ao fragmento m/z 43 e através do desaparecimento do fragmento m/z 58, pode-se concluir que houve o acréscimo de 2 unidades de massa equivalente a dois átomos de hidrogênio na carbonila. O fragmento do íon molecular, m/z 256, não é observado, pois a perda de água em alcoóis é muito facilitada, gerando o fragmento m/z 238. Também pode ser observado a sobreposição da intensidade relativa dos fragmentos m/z 97 e m/z 167, confirmando a presença das duas metilas como ramificações nos carbonos 6 e 10 da cadeia principal.

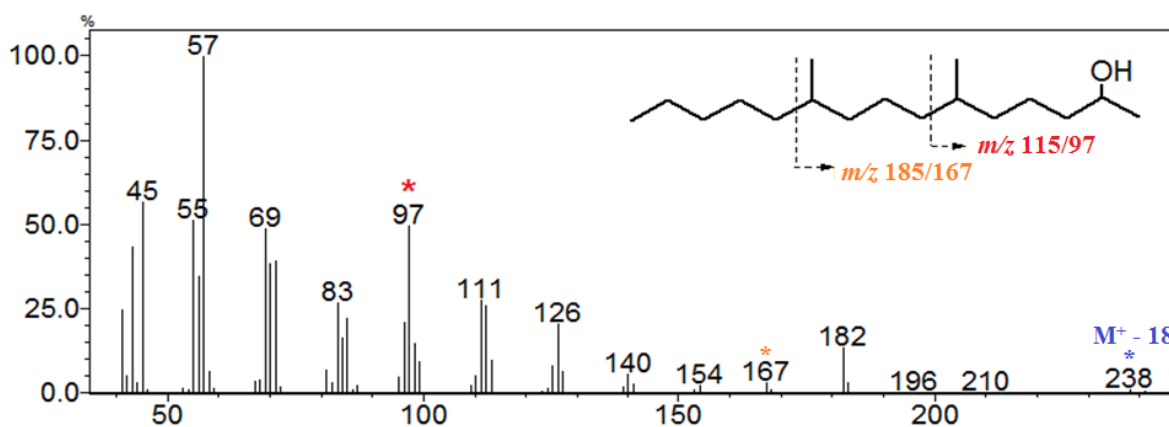


Figura 48. Espectro de massas do álcool derivado da redução do composto macho-específico de *Pallantia macunaima*.

Com a análise por CG-EM do produto da sililação do álcool derivado, foi comprovada a posição da carbonila no carbono 2 da cadeia principal com o fragmento m/z 117 como pico base do espectro de massas, que pode ser observado na Figura 49. Também podem ser

observados o íon molecular em m/z 328 e um fragmento intenso em m/z 313 gerado devido a perda de uma metila ligada ao silício, característicos de silil éteres.

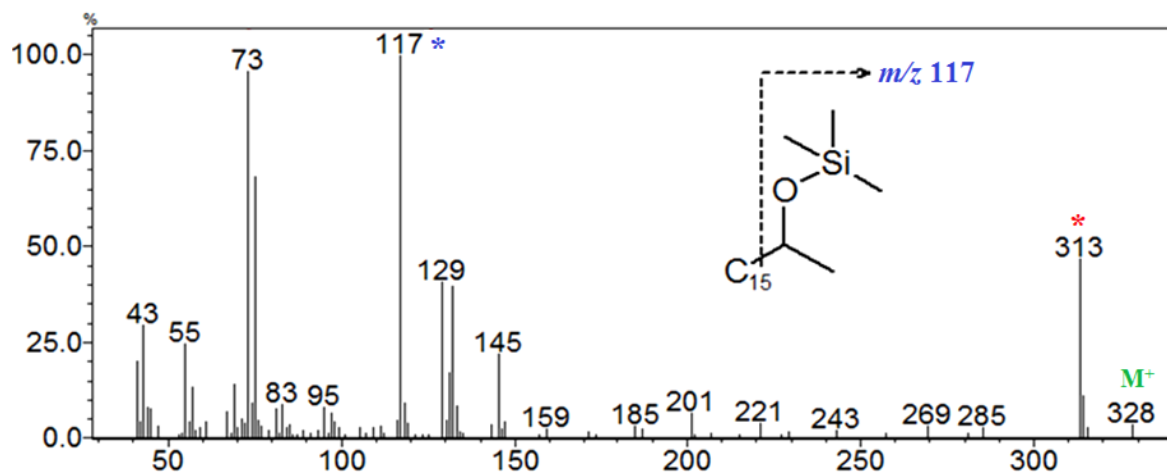


Figura 49. Espectro de massas do produto da reação de sililação com TMSCl do composto macho-específico de *Pallantia macunaima*.

Após ter sido proposta a estrutura química do feromônio de *P. macunaima*, iniciou-se a etapa de síntese para que fosse possível comprovar esta estrutura, através de coinjeção do padrão sintético com o extrato dos voláteis dos machos e através de bioensaios e testes de eletrofisiologia com o padrão. A síntese foi realizada pelo aluno de doutorado Rafael Soldi, do Laboratório de Semioquímicos – UFPR.

Com a obtenção do padrão sintético, foi realizado a coinjeção com o produto natural (Figura 50). Não houve coeluição do composto sintético com o natural, embora os espectros de massas destes compostos fossem bastante semelhantes. Foi possível notar apenas algumas pequenas diferenças, como nas intensidades dos fragmentos m/z 58, m/z 95 e m/z 137 (Figura 51).

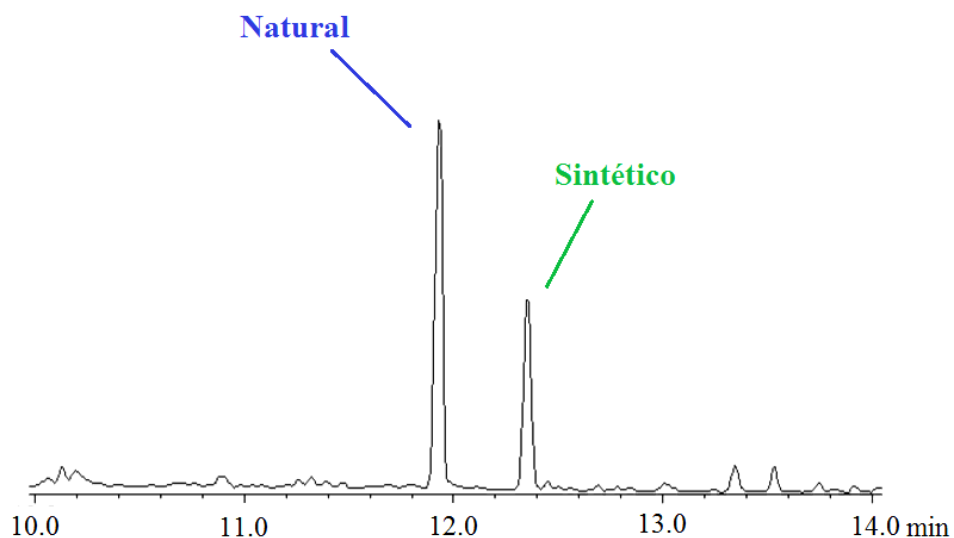


Figura 50. Coinjeção em CG com coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos *Pallantia macunaima* e da 6,10-dimetilpentadecan-2-ona.

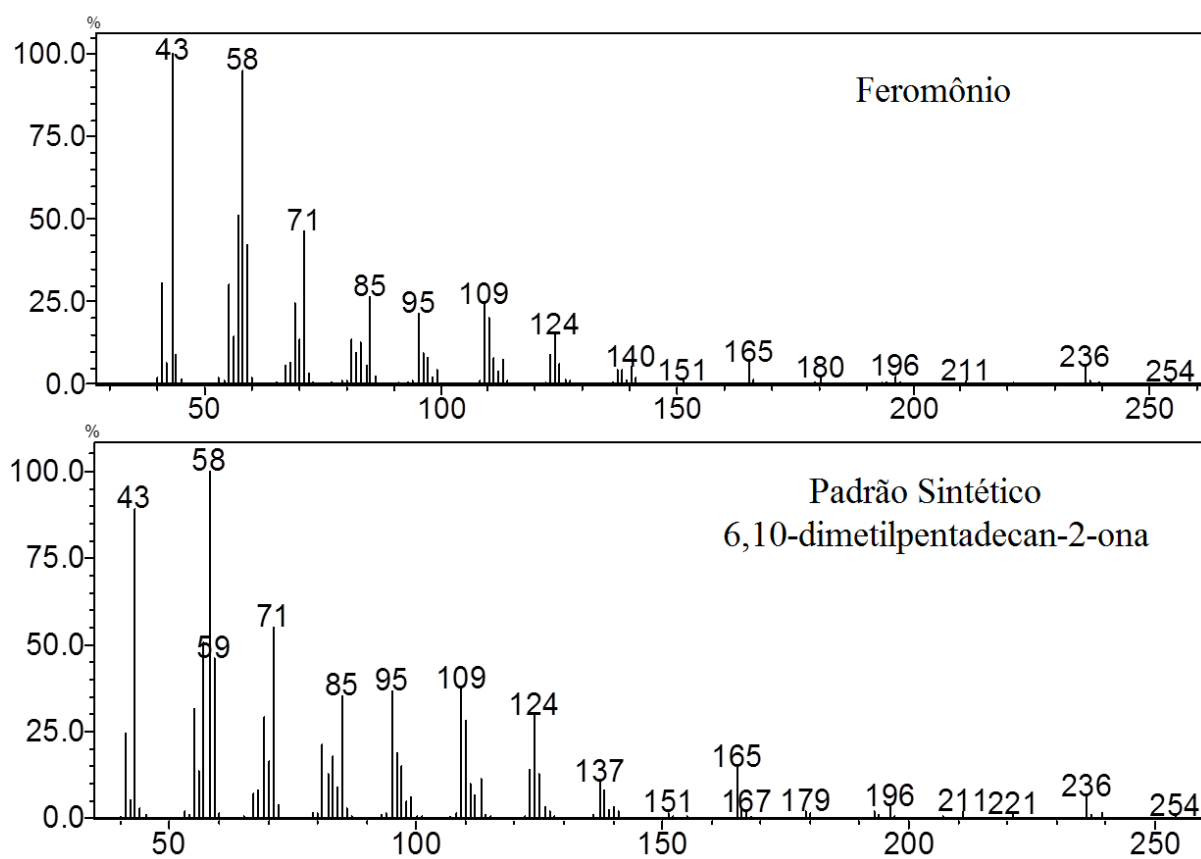
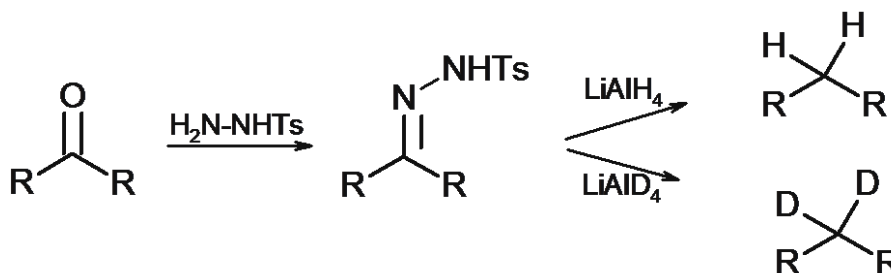


Figura 51. Espectros de massas do composto produzido pelos machos *Pallantia macunaima* e da 6,10-dimetilpentadecan-2-ona.

Através da grande diferença dos tempos de retenção do composto natural e do padrão sintético, foi levantada a possibilidade de a estrutura possuir 14 carbonos na cadeia principal e 3 metilas como ramificações.

Para melhor avaliar as posições das ramificações, foi realizada a reação do produto natural com a tosilhidrazina para a obtenção da tosilhidrazona. Em seguida, o produto foi reduzido com LiAlH_4 e LiAlD_4 para obtenção do esqueleto básico de carbono com dois hidrogênios ou deutérios no lugar do oxigênio (Esquema 1). Estes dois produtos foram analisados por CG-EM e os espectros obtidos estão apresentados na Figura 52.



Esquema 1. Etapas para obtenção do esqueleto básico de carbono a partir de uma cetona.⁷⁹

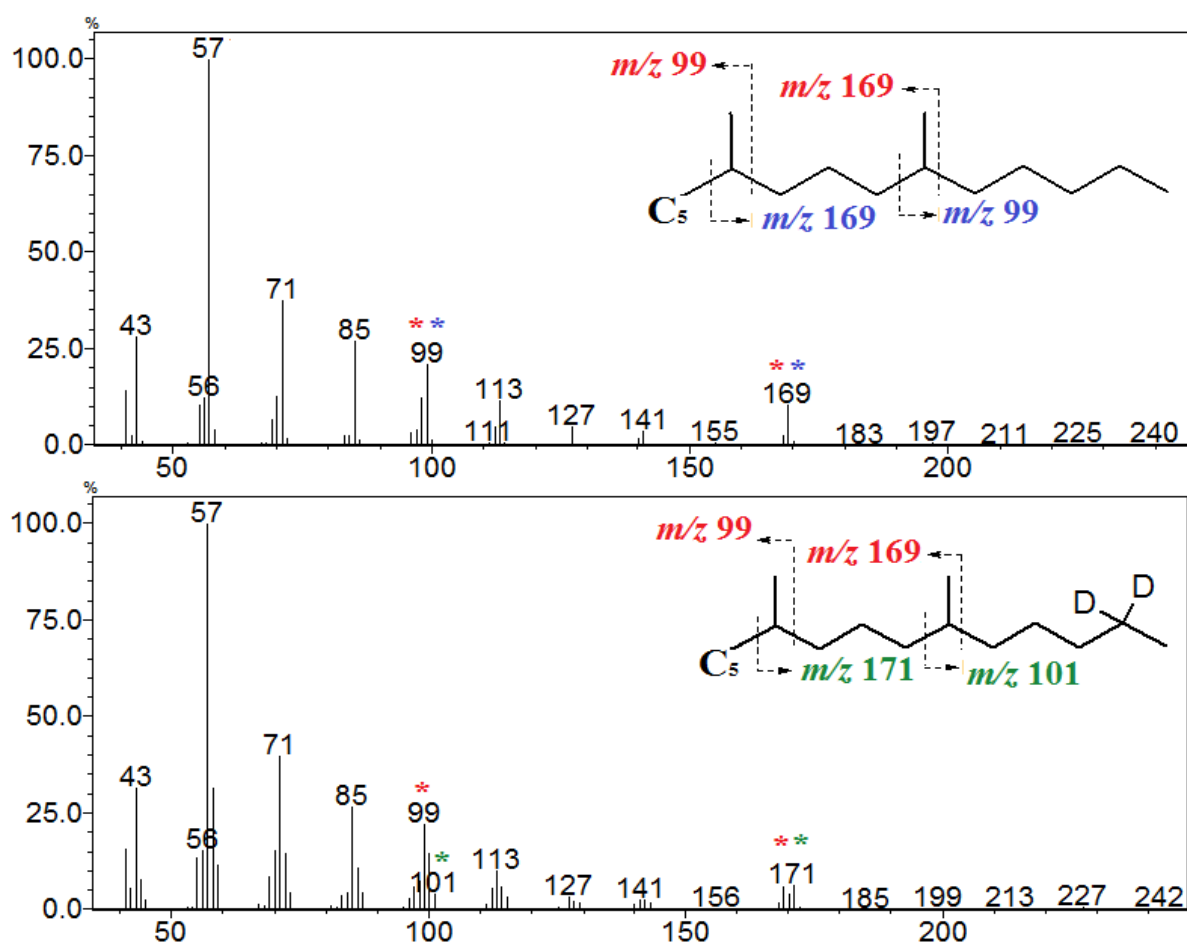


Figura 52. Espectros de massas do hidrocarboneto e deutereto derivado do composto macho-específico de *Pallantia macunaima*, com destaque aos fragmentos m/z 99, m/z 101, m/z 169 e m/z 171.

Analisando o espectro de massas do hidrocarboneto, foi possível observar a intensidade relativa sobressalente do fragmento m/z 169. Considerando a estrutura atribuída anteriormente, este fragmento seria relativo às metilas nas posições 6 e 10 da cadeia carbônica. Foi observado também no espectro do deutereto a presença do fragmento m/z 101 que não ocorria no espectro do hidrocarboneto. Além disso, no espectro do deutereto, a intensidade relativa do fragmento m/z 169 reduz em cerca de 50% e ocorre o aparecimento do fragmento m/z 171, que também se sobressai em comparação às intensidades relativas dos fragmentos adjacentes, porém mais discretamente. Através deste conjunto de dados, somado

à grande semelhança entre os espectros de massas do feromônio natural e a cetona sintética, a presença de duas ramificações metílicas nas posições 6 e 10 continuou sendo considerada, faltando apenas a atribuição da posição da terceira metila.

Procurando por mais fragmentos com intensidades relativas sobressalentes no espectro do hidrocarboneto, verificou-se que o fragmento m/z 57, embora fosse o pico base em espectros de hidrocarbonetos de cadeia saturada, apresentava uma intensidade relativa muito maior que em hidrocarbonetos não ramificados (Figura 53).

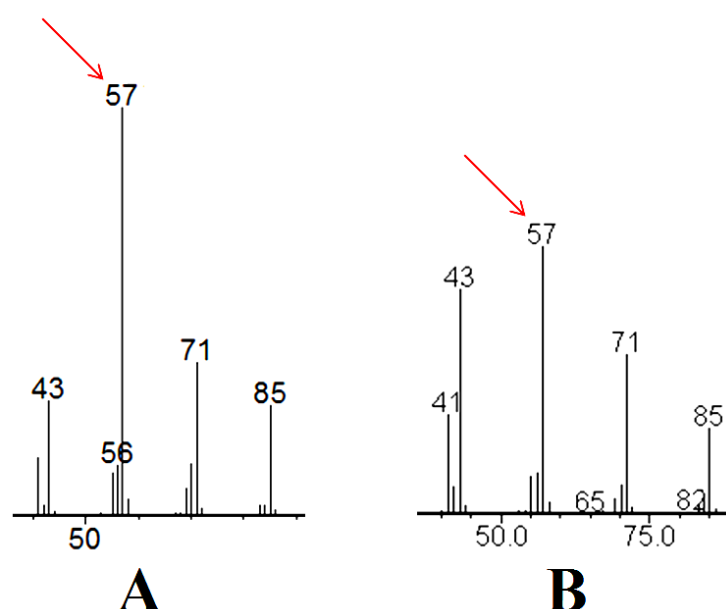


Figura 53. Comparação entre a intensidade relativa do fragmento m/z 57 nos espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de *Pallantia macunaima* (A) e do tridecano (B).

A partir desta constatação, foi sugerida a presença da terceira metila no carbono 12 da cadeia, a qual geraria um fragmento *sec*-butil (m/z 57), que é mais estabilizado que o *n*-butil e que justificaria sua grande intensidade relativa. No entanto, para esta posição ser a correta, o fragmento m/z 211 gerado pela quebra da ligação entre o carbono ligado à terceira

ramificação e seu adjacente, deveria estar presente no espectro do hidrocarboneto e ser substituído pelo fragmento m/z 213 no espectro do deutereto. Foi observado que estes dois fragmentos estavam presentes em seus respectivos espectros (Figura 54), suportando assim, a posição atribuída à ramificação. Dessa forma, foi sugerida uma segunda estrutura química para o composto macho-específico de *P. macunaima* como sendo a 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona.

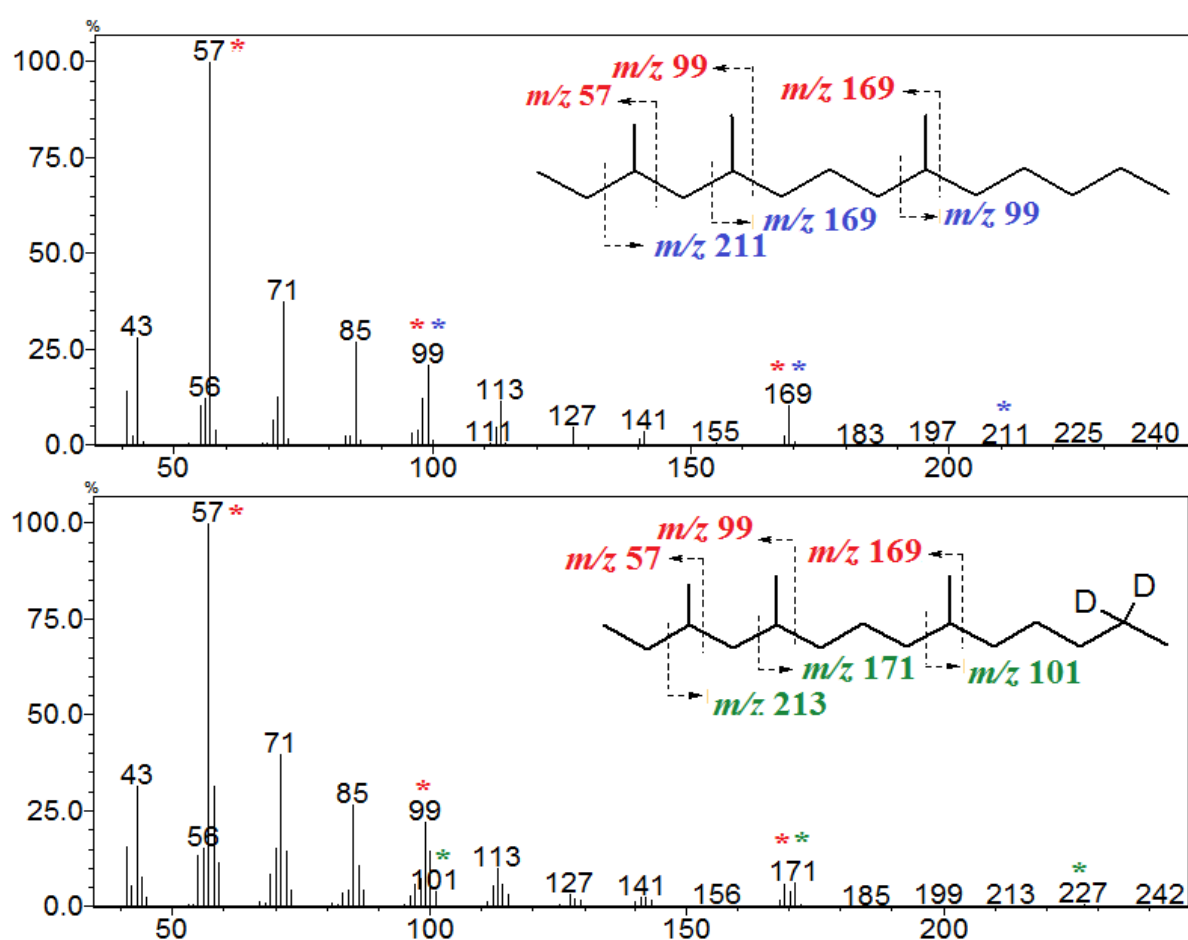


Figura 54. Espectros de massas do hidrocarboneto e deutereto derivado do composto macho-específico de *Pallantia macunaima*, com destaque aos fragmentos m/z 57, m/z 99, m/z 101, m/z 169, m/z 171, m/z 211 e m/z 213.

Foi realizada a coinjeção da segunda cetona sintética com o produto natural e, novamente, não houve coeluição, embora os tempos de retenção em coluna RTX-5 fossem muito próximos. Como pode ser visto na Figura 55, o composto sintético aparece em dois picos devido às formas diastereoisoméricas que esta molécula possui e o composto natural elui exatamente entre estes dois picos. Também pode ser observada a grande semelhança entre os espectros de massas, sugerindo que suas estruturas químicas são também bastante próximas (Figura 56).

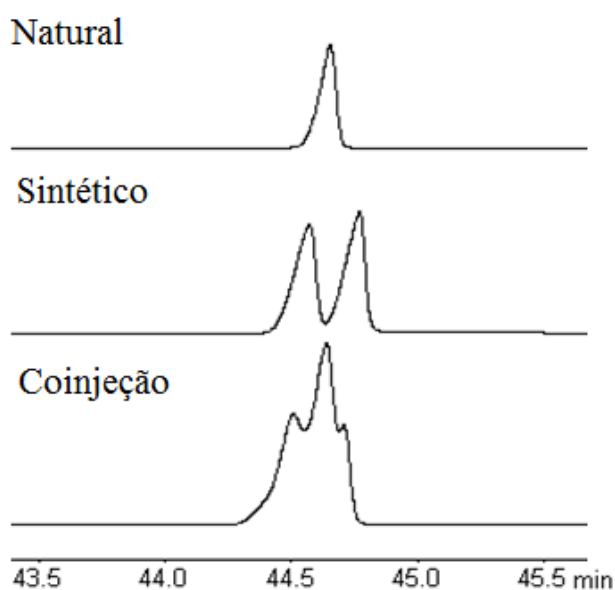


Figura 55. Comparação entre os tempos de retenção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos *Pallantia macunaima* e da 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona.

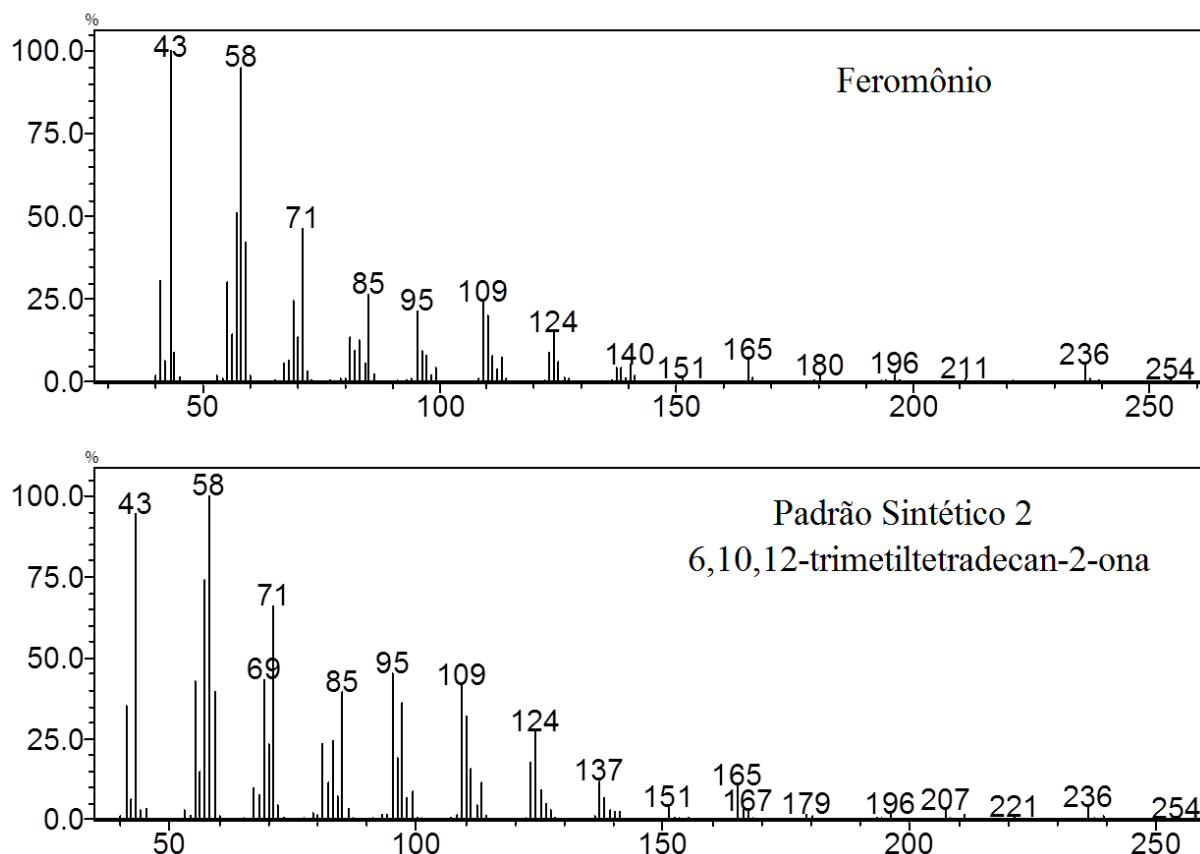


Figura 56. Espectros de massas do composto macho-específico produzido por *Pallantia macunaima* e da 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona.

Na procura de características dos espectros de massas do composto natural e seus derivados, chegou-se a conclusão que a chave para a determinação das posições corretas das ramificações, estaria na diferença entre as intensidades dos fragmentos presentes nos espectros do hidrocarboneto e do deutereto. Procurou-se, então, verificar quais os fragmentos que estavam presentes no espectro do hidrocarboneto e não estavam, ou estavam em menor intensidade, no espectro do deutereto.

Com isso, através do programa de análise de dados do espectrômetro, subtraiu-se o espectro do hidrocarboneto do deutereto e obteve-se um espectro com melhor visualização das principais diferenças nas intensidades entre os dois. Assim, os fragmentos com intensidade negativa estariam relacionados à parte da molécula que possuía os átomos de

deutério. Como pode ser visto na Figura 57, os fragmentos de intensidade negativa que se sobressaem em relação aos fragmentos vizinhos são m/z 99, m/z 169 e m/z 225.

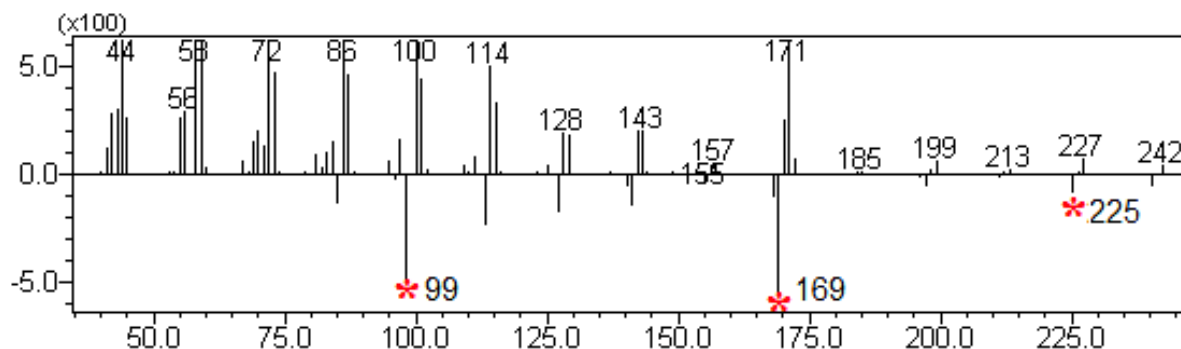


Figura 57. Espectro de massas resultante da subtração do espectro do deutereto – espectro do hidrocarboneto.

Os dois primeiro fragmentos, m/z 99 e m/z 169, estavam em concordância com as propostas anteriores, que apresentavam as duas metilas posicionadas nos carbonos 6 e 10. Já o fragmento em m/z 225 levou à conclusão de que a terceira metila estaria na posição 13, e não na 12, sendo um fragmento isobutil e não *sec*-butil. A proposta das ramificações nas posições 6,10 e 13 levou à estruturas as quais suas fragmentações também condiziam com os espectros de massas do hidrocarboneto e deutereto (Figura 58). A partir destes resultados, foi elaborada uma terceira proposta da estrutura química do composto macho-específico de *P. macunaima* como sendo a 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.

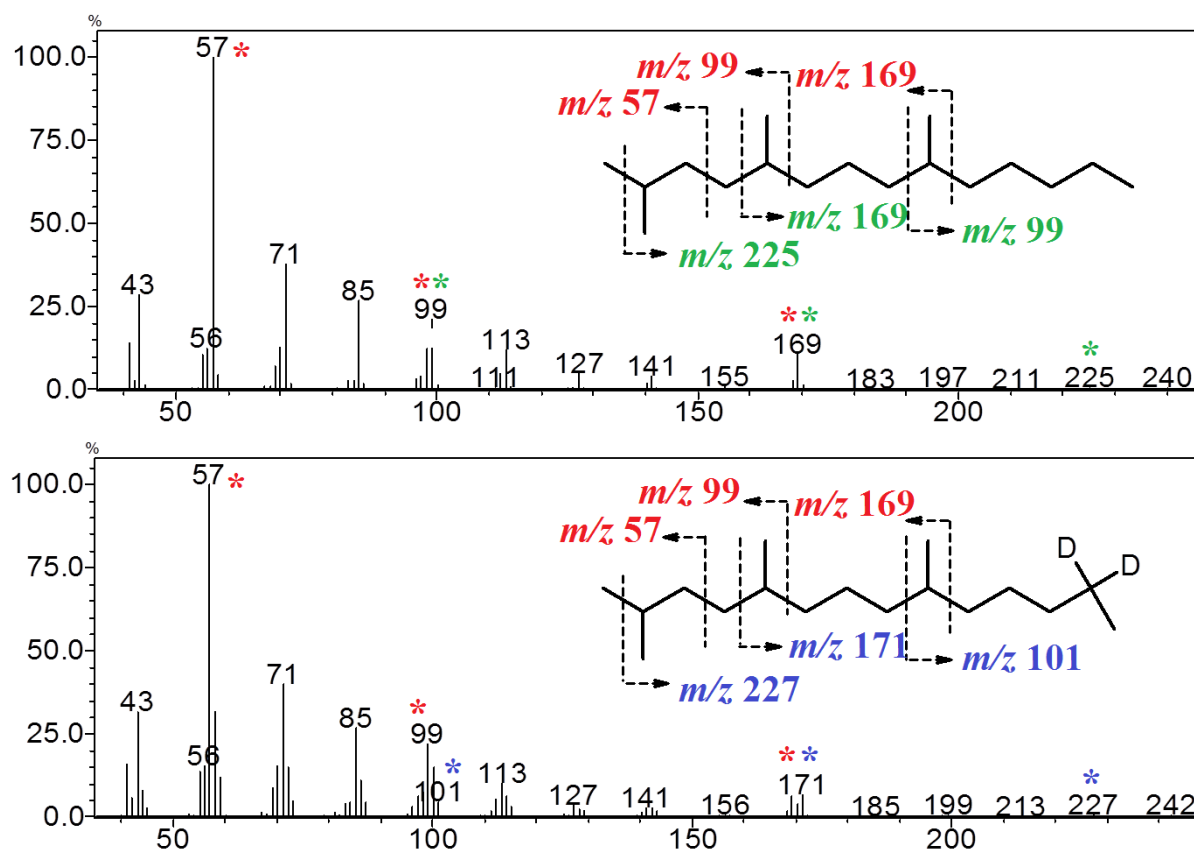


Figura 58. Espectro de massas do hidrocarboneto e deutereto derivados do composto macho-específico de *Pallantia macunaima*.

Em posse da terceira cetona sintética, foi realizada a coinjeção com o produto natural (Figura 59) onde foi observada a coeluição dos dois compostos em três colunas diferentes, RTX-5, RTX-WAX e EC-1. Também foi possível observar que os espectros de massas e infravermelho do composto sintético foram idênticos ao do produto natural, confirmando assim a estrutura química do composto macho-específico produzido por *P. macunaima* como sendo a 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona (Figura 60).

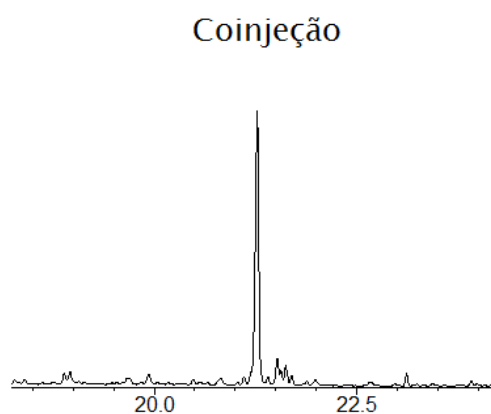


Figura 59. Cromatograma resultante da coinjeção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos *Pallantia macunaima* e da 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.

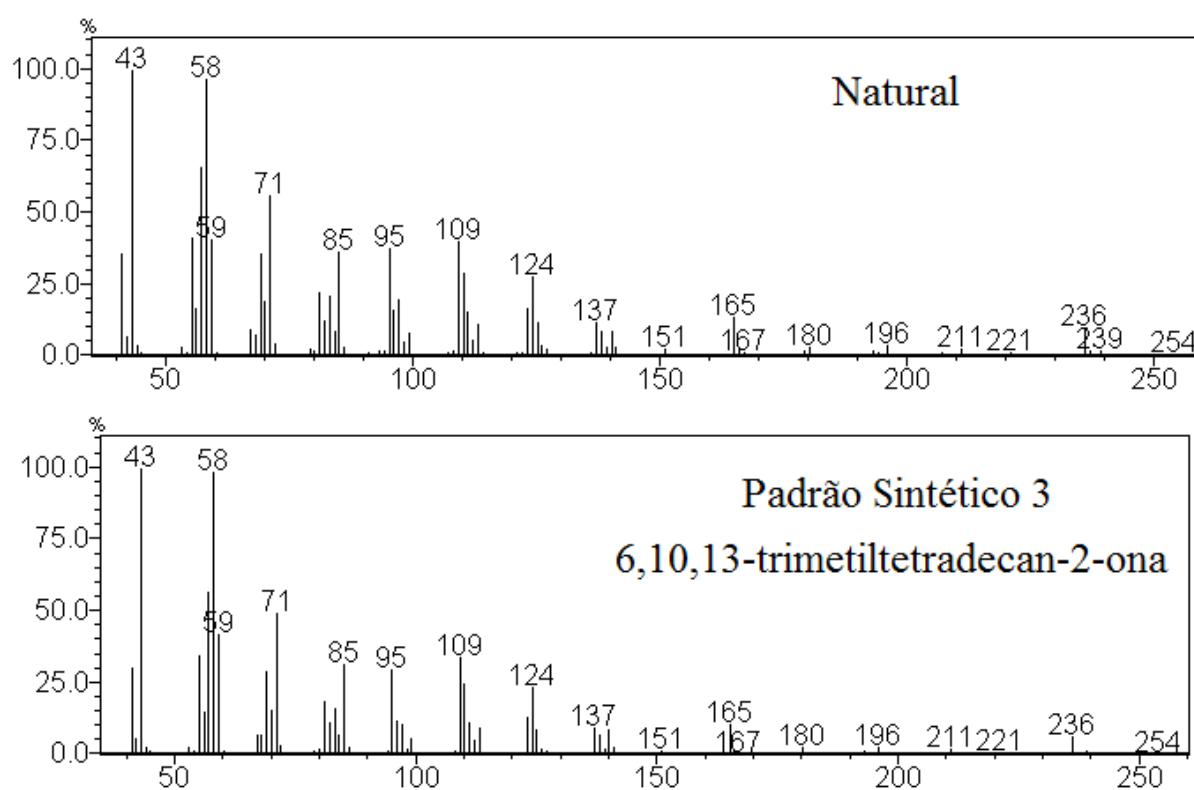


Figura 60. Comparação entre espectros de massas do composto produzido pelos machos *Pallantia macunaima* e da 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.

Análises por CG-EAG foram realizadas no intuito de verificar se esta terceira cetona sintética era reconhecida pelas antenas das fêmeas, como foi o composto natural, e os resultados obtidos mostraram a bioatividade para este composto (Figura 61).

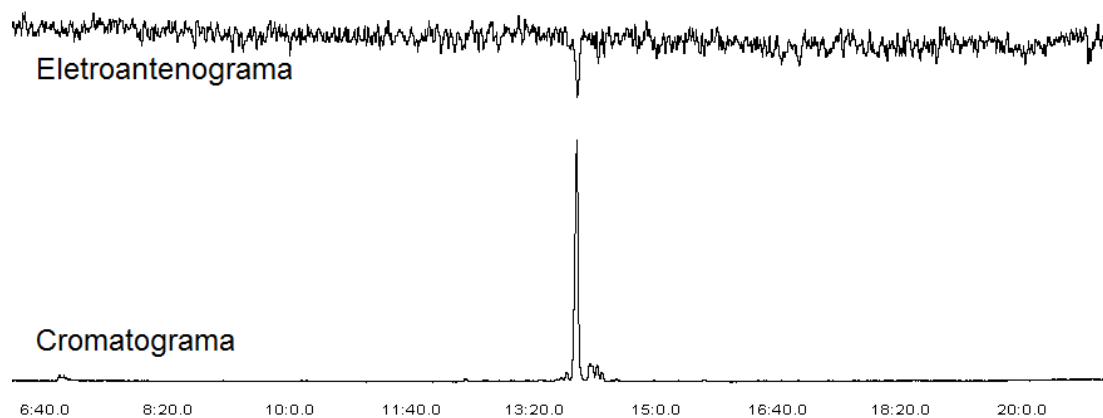


Figura 61. Resposta da antena de uma fêmea *Pallantia macunaima* para o 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona.

Também foram realizados bioensaios com olfatômetro de dupla-escolha para verificar a atratividade do composto sintético para as fêmeas e machos desta espécie. Das 34 fêmeas testadas, 25 (76%) escolheram a fonte de odor que continha o feromônio sintético, mostrando uma forte atratividade deste composto sintético ($P < 0,001$, Figura 62). Dos 10 machos testados, apenas 4 (36%) escolheram a fonte de odor que continha o feromônio sintético, confirmando que o feromônio é atrativo apenas para as fêmeas desta espécie.

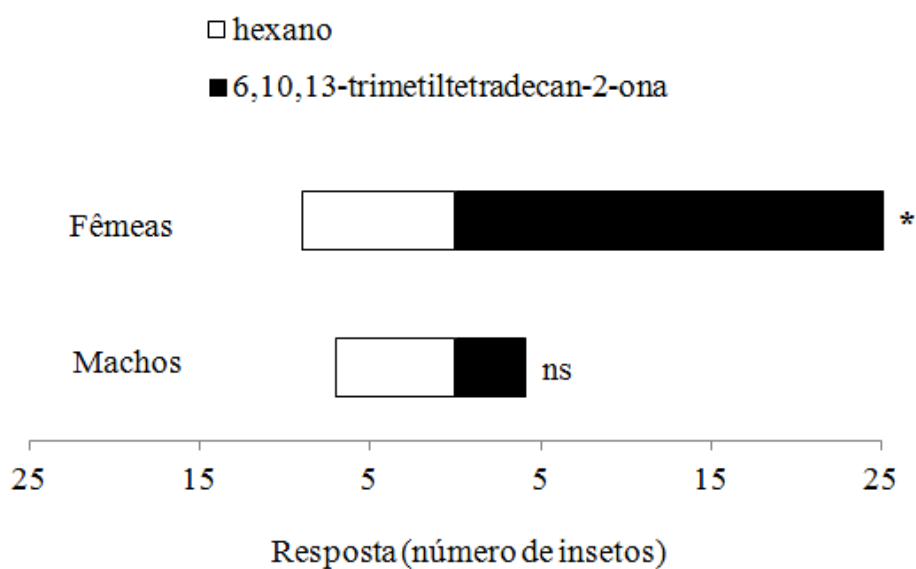


Figura 62. Resultados dos testes de dupla escolha feitos em olfatômetro em Y com insetos fêmeas (N = 34) e machos (N = 11) da espécie *Pallantia macunaima*, testando a atratividade do 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona vs. hexano (controle). Teste de Qui-quadrato, $P < 0,001$.

Estes resultados são similares aos obtidos nos bioensaios com o feromônio natural, comprovando assim o 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona como sendo o feromônio sexual de *P. macunaima*.

2.4.2. *Pellaea stictica*



Figura 63. Exemplar de inseto adulto da espécie *Pellaea stictica*.

Com a comparação dos cromatogramas obtidos pelas análises dos voláteis de machos e fêmeas da espécie *P. stictica* (Figura 63), também foi possível observar um composto sexo-específico presente nos voláteis dos machos (Figura 64). Este composto apresentou índice de Kovats de 1876 para coluna RTX-5 e 2147 para coluna RTX-WAX.

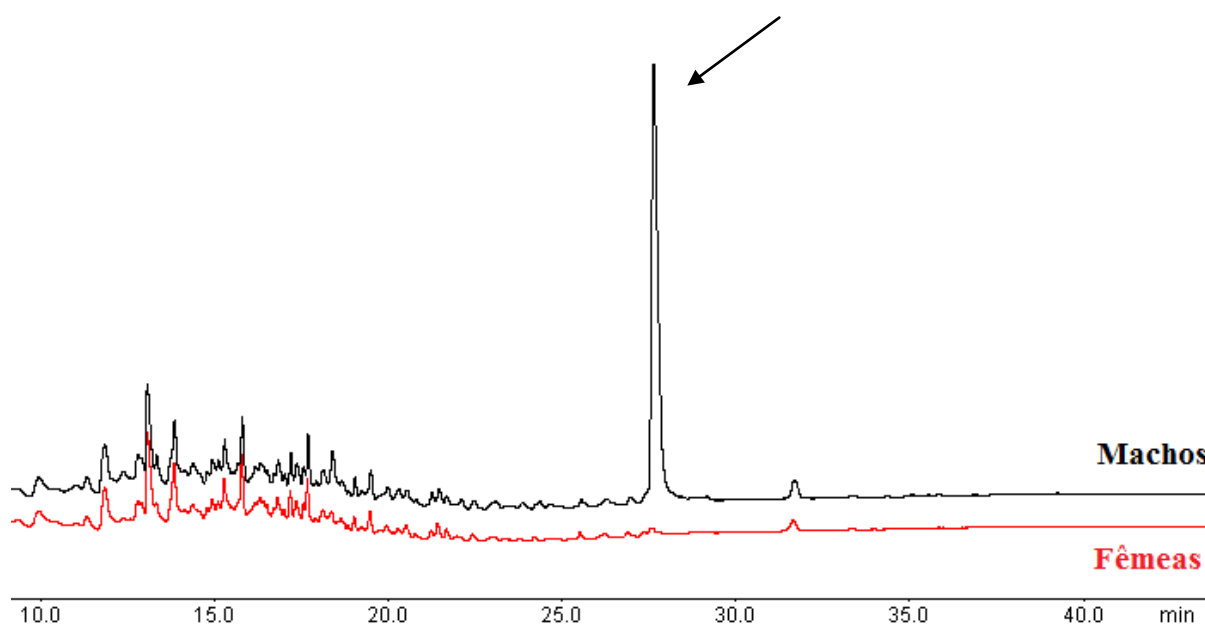


Figura 64. Comparação dos cromatogramas obtidos da aeração dos voláteis de machos e fêmeas da espécie *Pellaea stictica*. Análise realizada na coluna RTX-WAX.

Para verificar se há o reconhecimento do composto sexo-específico pelos insetos desta espécie foram realizados testes de eletrofisiologia com antenas de adultos machos e fêmeas. Não foi observada a perturbação da antena de macho para os compostos presentes no extrato dos voláteis dos machos, mas obteve-se resposta quando utilizada as antenas de fêmeas (Figura 65).

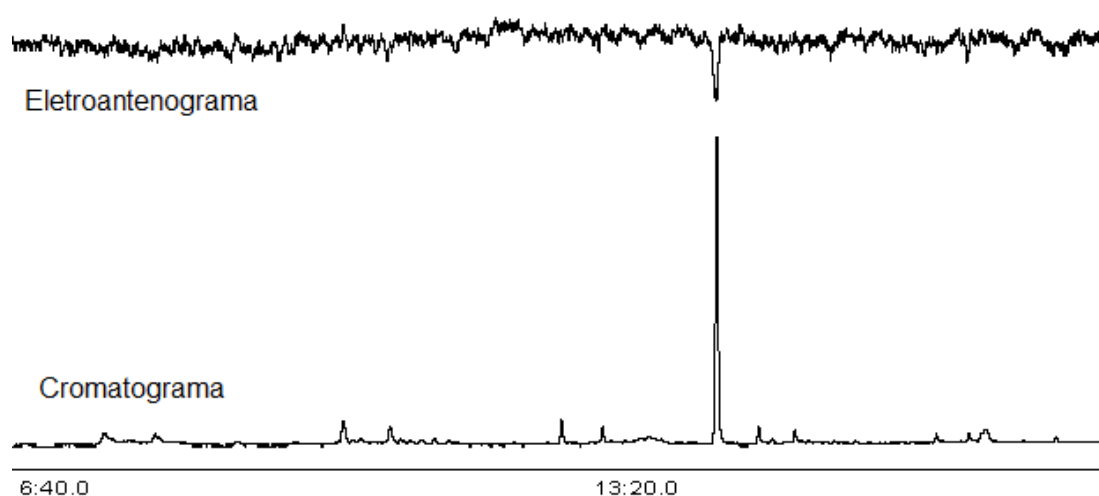


Figura 65. Perturbação de antenas de fêmeas frente ao extrato de aeração dos voláteis de machos da espécie *Pellaea stictica*.

Com os testes comportamentais verificou-se que o extrato contendo os voláteis dos machos é significativamente atrativo apenas para as fêmeas desta espécie, quando comparado com os voláteis da planta hospedeira (Figura 66). Estes resultados, somado aos obtidos nas análises eletrofisiológicas, indicaram o composto macho-específico como feromônio sexual desta espécie.

A produção diária do composto macho-específico foi marcadamente dependente da presença luz. Durante as 12 horas de luz, ocorreu em média 66% da produção diária do composto ($P < 0,01$) (Figura 67).

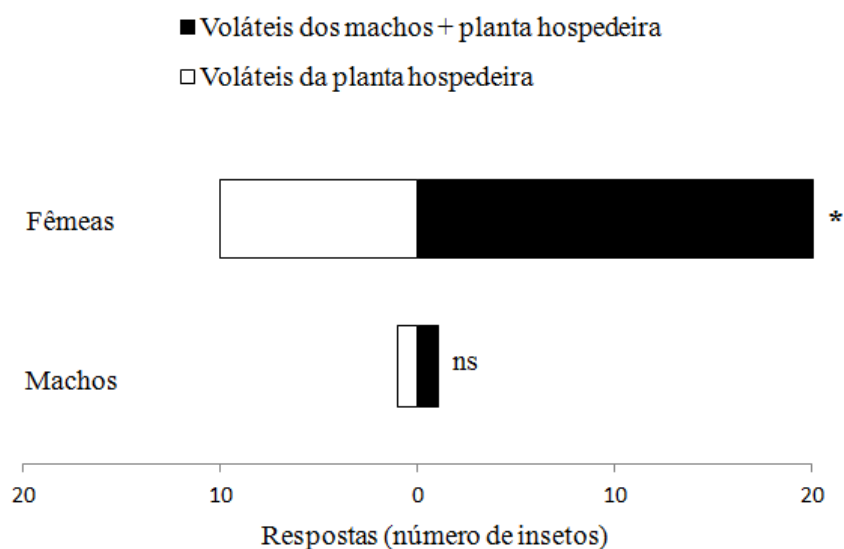


Figura 66. Respostas de machos e fêmeas *Pellaea stictica* aos voláteis presentes nos extratos de macho + planta hospedeira vs. voláteis de planta hospedeira (*Ligustrum lucidum* (Oleaceae). Os dados foram analisados com o teste Qui-quadrado ($P < 0.05$).

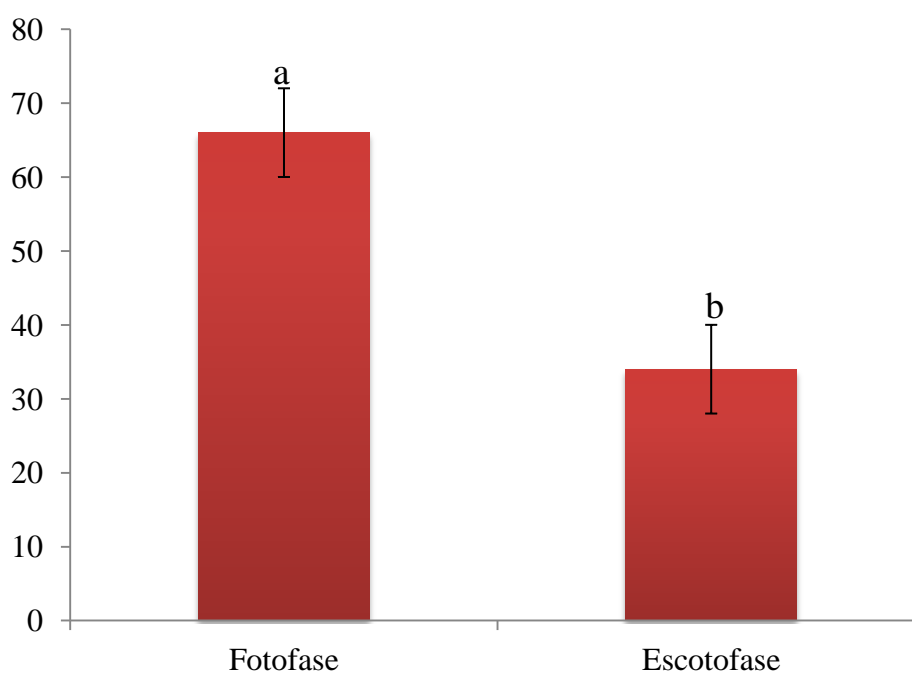


Figura 67. Porcentagem de emissão do composto presente nos extratos de machos de *Pellaea stictica* na fotofase e na escotofase ($n = 4$). Colunas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Anova + Tukey, $P < 0,01$).

No espectro de infravermelho do composto macho-específico (Figura 68) foi possível observar duas bandas em 3273 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} que caracterizam a função álcool (O-H), e a banda em 1042 cm^{-1} que caracteriza alcoóis primários, além das bandas referentes à cadeia carbônica na região de 2900 cm^{-1} e em 1466 cm^{-1} .⁵⁵

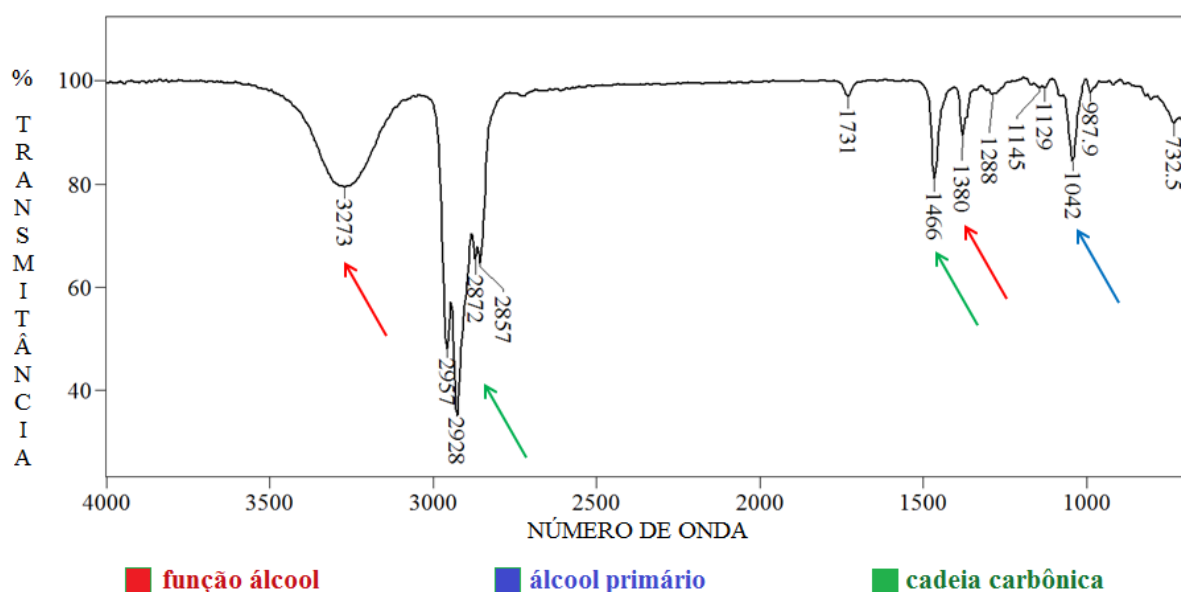


Figura 68. Espectro de infravermelho do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica*.

O espectro de massas deste composto (Figura 69) não apresentou o fragmento do íon molecular (m/z 270), sendo que o último fragmento, em m/z 252, é resultado da eliminação de uma molécula de água ($M^+ - 18$).⁵⁴ Foi possível observar possíveis ramificações na cadeia principal através do aumento da intensidade dos fragmentos m/z 83, m/z 125 e m/z 210 em relação aos anteriores na sequência que representa a cadeia carbônica saturada (principais fragmentos com diferença de 14 unidades de massa).

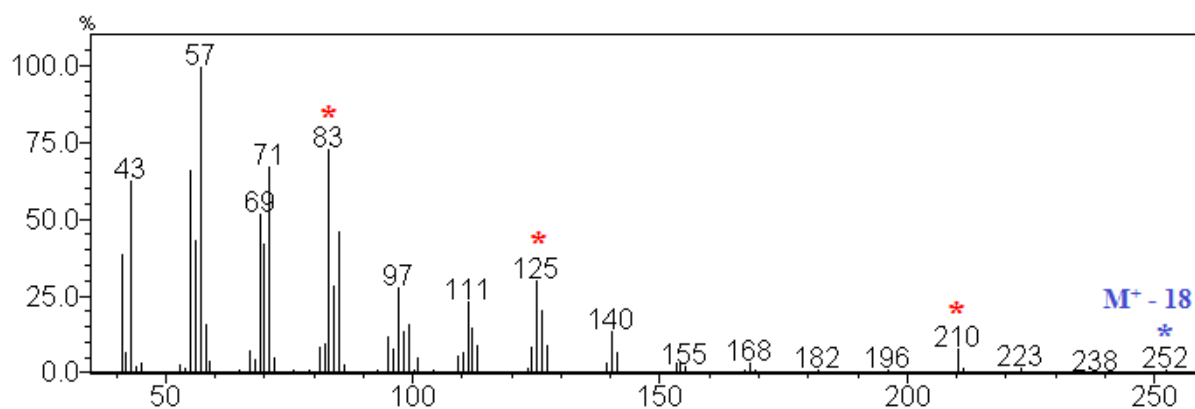


Figura 69. Espectro de massas do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica*.

Para a confirmação da posição da hidroxila e das ramificações, foi realizada uma série de microderivatizações com os extratos obtidos na aeração.

Em primeiro lugar, foi feita a reação com TMSCl com o principal propósito de se comprovar a posição da hidroxila na cadeia carbônica. O objetivo foi alcançado e pode-se observar o fragmento m/z 103 indicando ser um álcool primário, como pode ser observado na Figura 70.

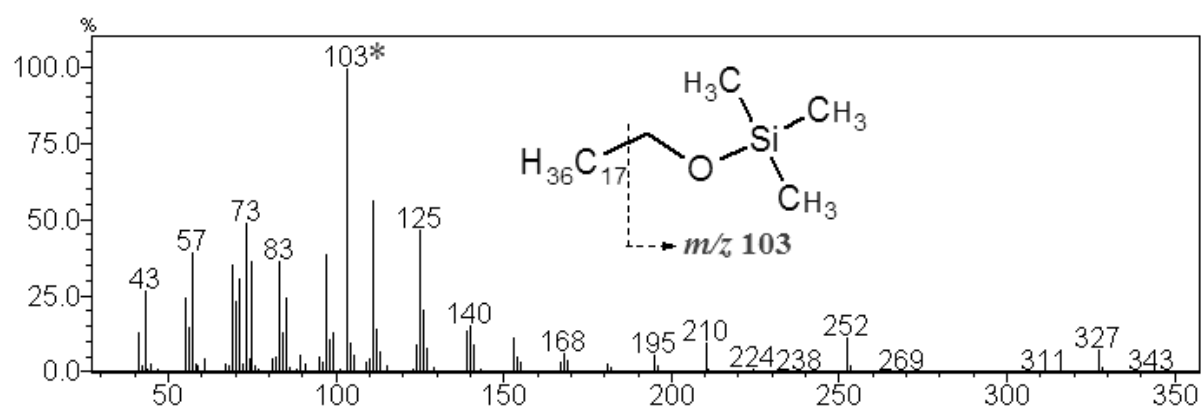


Figura 70. Espectro de massas do produto da reação do composto macho-específico da espécie *Pellaea stictica* com TMSCl.

O espectro de massas obtido do produto da oxidação feita com reagente de Jones apresentou pico base em m/z 87, 27 unidades de massa a mais do que o esperado para ácidos carboxílicos, associado ao rearranjo de McLafferty⁵⁴ (Figura 71). Dessa forma, foi levantada a hipótese da presença de ramificações próximas à hidroxila.

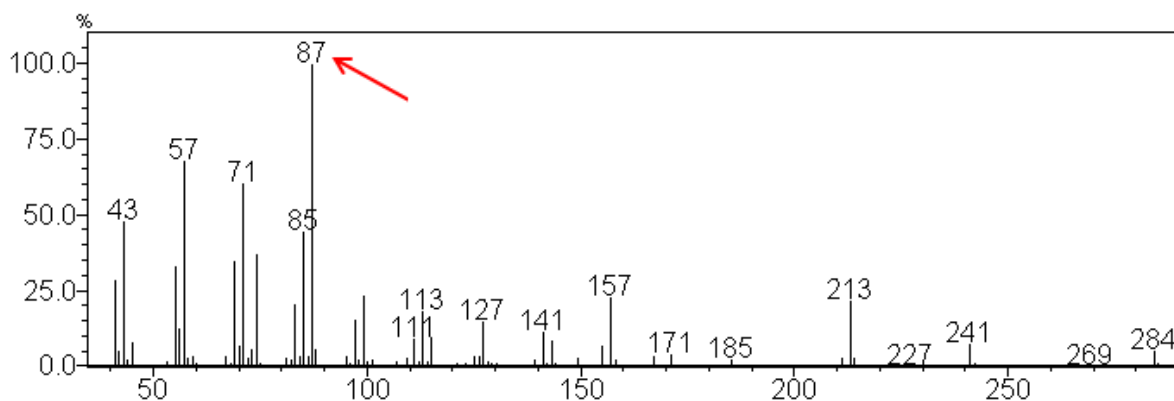


Figura 71. Espectro de massas do ácido carboxílico derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica*.

Em seguida, através do ácido carboxílico gerado, foi realizada a derivatização para obtenção do éster metílico. Uma das mais rápidas reações de formação de ésteres metílicos é a reação com diazometano (CH_2N_2). Este reagente é um gás à temperatura ambiente e usualmente é utilizado diluído em éter ou THF.⁴⁷

Com a obtenção do espectro de massas do éster metílico, a localização de uma ramificação metila próxima à hidroxila foi confirmada com o aparecimento de dois fragmentos intensos em m/z 88 e m/z 101. A localização de uma metila ligada ao carbono α à carboxila do éster resulta no pico base em m/z 88, devido à fragmentação da molécula logo após a ramificação por rearranjo de McLafferty (Figura 72), e o segundo pico mais intenso, m/z 101, é resultante da ocorrência da fragmentação com um carbono a mais da cadeia principal da molécula.

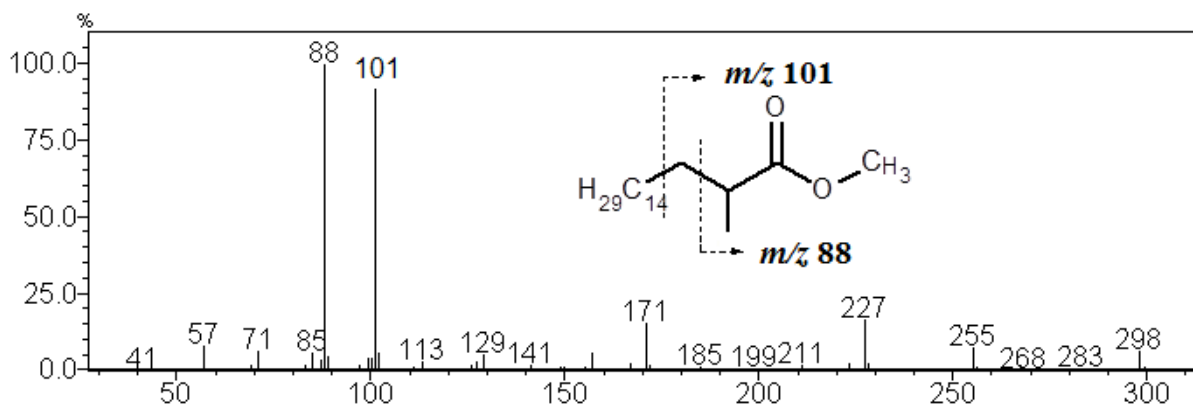


Figura 72. Espectro de massas do éster metílico derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica*.

As fragmentações presentes nos espectro de massas do hidrocarboneto e do deutereto, obtidos pela reação de mesilação seguida de redução com LiAlH_4 e LiAlD_4 , possibilitaram a atribuição da posição de duas outras ramificações metílicas. A maior intensidade dos fragmentos m/z 85, m/z 155 e m/z 197 em relação aos fragmentos anteriores, sugerem as duas outras ramificações nos carbonos 4 e 8 da cadeia principal (Figura 73A). Estas duas posições podem ser comprovadas a partir da diminuição da intensidade dos fragmentos m/z 85 e m/z 155 e o surgimento dos fragmentos m/z 86 e m/z 156 no espectro do composto que possui o átomo de deutério (Figura 73B).

Com estes resultados, foi proposta a estrutura molecular para o composto produzido pelos machos da espécie *P. stictica* como sendo o 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol, e suas fragmentações podem ser observadas na Figura 74.

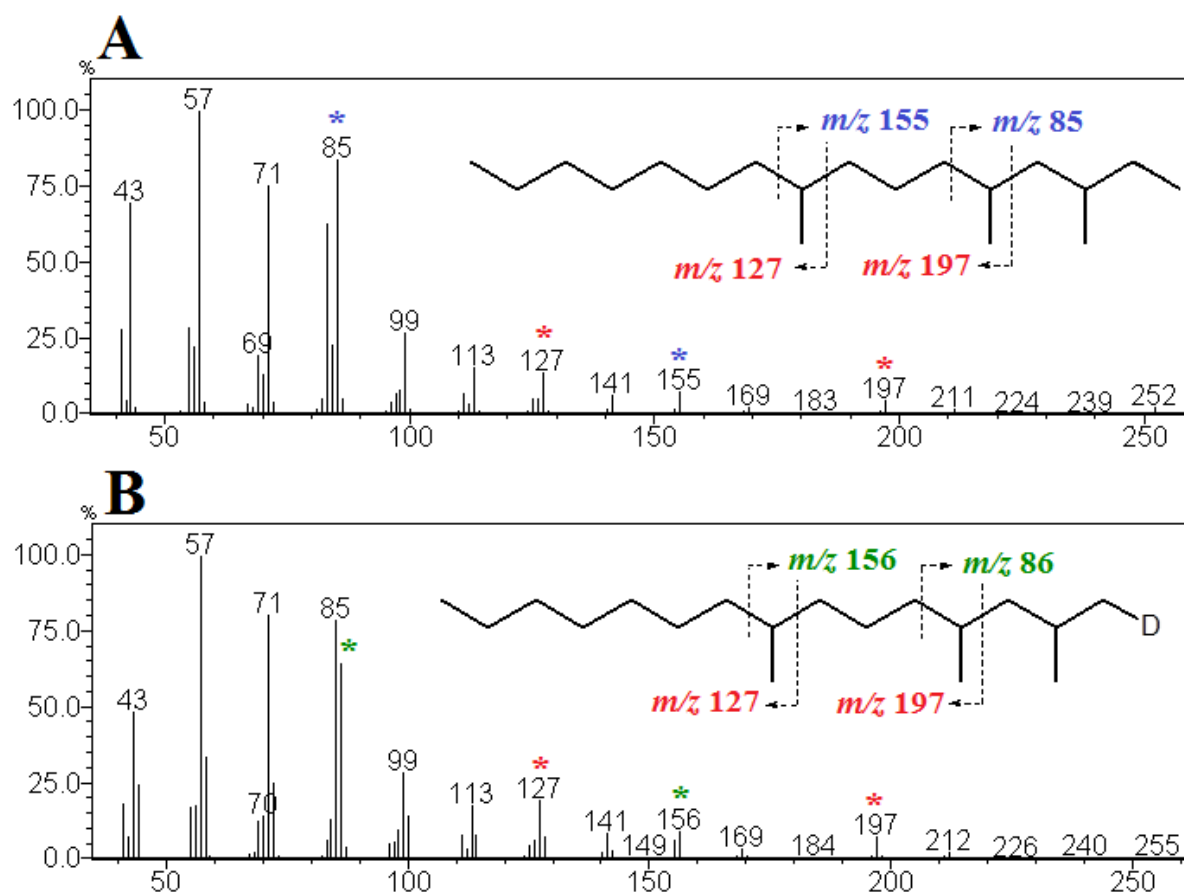


Figura 73. Espectros de massas do hidrocarboneto (A) e deutereto (B) derivados do composto macho-específico de *Pellaea stictica*.

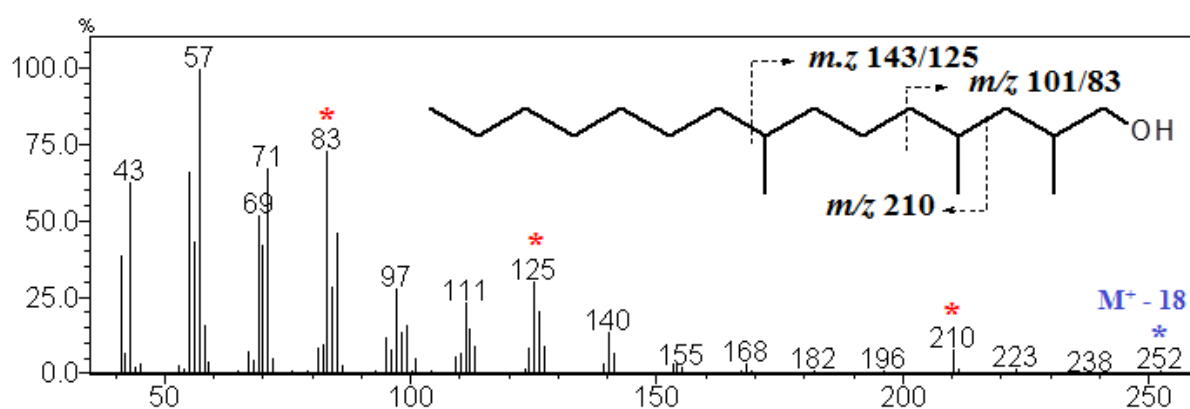
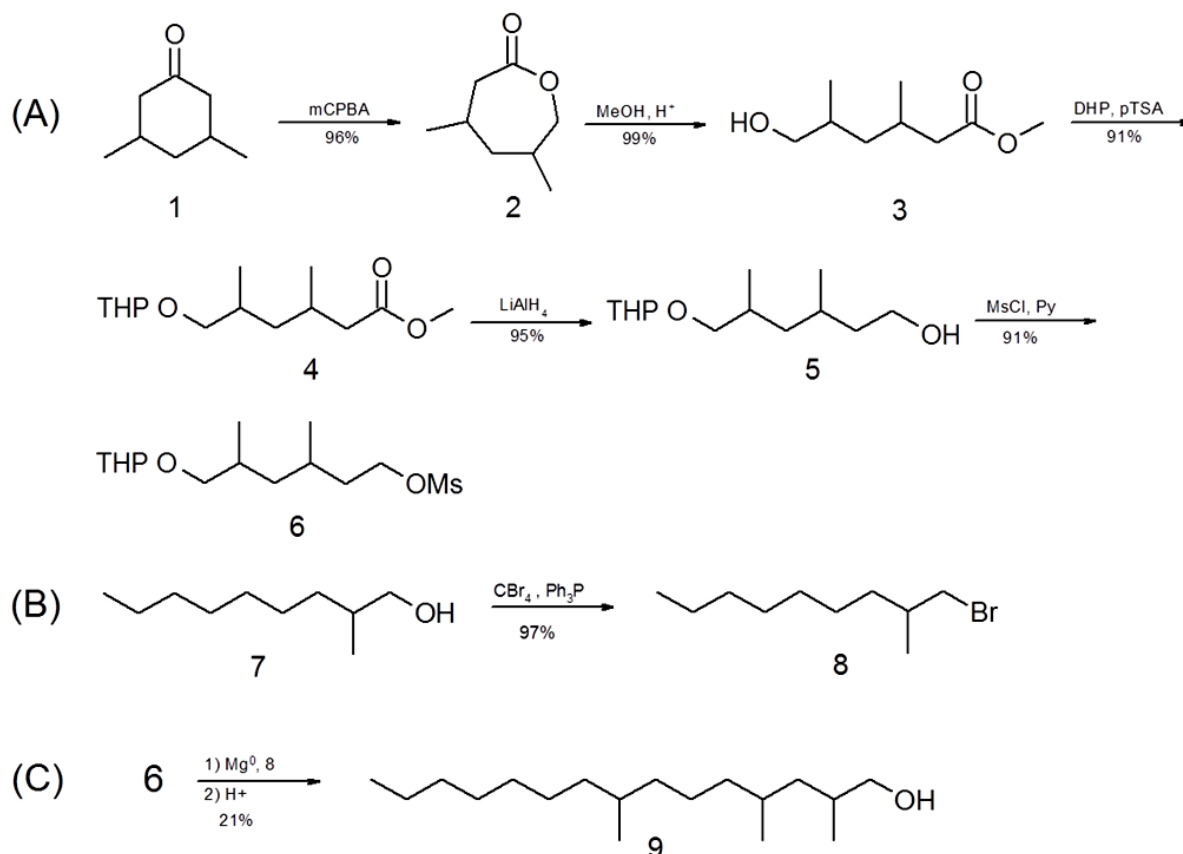


Figura 74. Espectro de massas e proposta para a estrutura química do feromônio sexual de *Pellaea stictica*.

Dessa forma, foi iniciada a síntese do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol a fim de confirmar a identidade do feromônio. A rota sintética proposta é composta por três blocos (A, B e C), como pode ser visto no Esquema 2.



Esquema 2. Rota sintética do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**).

O bloco A iniciou com a oxidação da 3,5-dimetilciclohexanona (**1**) pelo método Baeyer-Villiger que utilizou o ácido *m*-cloroperbenzóico para gerar a 4,6-dimetil-2-oxepanona (**2**) em 96% de rendimento⁸². O produto **2** foi caracterizado por CG-EM (Página 165), onde foi possível verificar a presença do fragmento do íon molecular (M⁺) de *m/z* 142, e por RMN de ¹³C (Página 166), onde pode ser observada a presença do sinal característico do carbono da carboxila em 174,9 ppm, assim como o aparecimento de um sinal de carbono

oximetílico em 74,2 ppm. No espectro de RMN de ^1H (Página 166) pode-se notar o aparecimento de um multipeto entre 3,42 e 4,20 ppm, referente aos dois hidrogênios ligados ao carbono vizinho ao oxigênio do anel.

A lactona **2** foi hidrolisada em metanol utilizando ácido sulfúrico como catalisador, resultando no 6-hidroxi-3,5-dimetilhexanoato de metila (**3**) em rendimento quantitativo, que teve sua hidroxila protegida com DHP gerando o éster **4** (91% de rendimento). O hidroxí-ester **3** apresentou em seu espectro de massas (Página 167) o pico base de m/z 101 e os fragmentos m/z 59 e m/z 144, relativos à quebra das ligações entre os carbonos que contem as ramificações metilas com os carbonos adjacentes. Já no espectro de massas do produto da proteção **4** (Página 168), foi possível verificar principalmente o pico base de m/z 85, característico para compostos que possuem o grupo tetraidropirano (THP). No espectro de RMN de ^{13}C do composto **4** (Página 169), observou-se os sinais referentes ao carbono terciário ligado aos dois oxigênios do grupo THP em 94,6, 98,7 e 99,13 ppm, bem como o sinal do carbono da carboxila em 173,64 ppm. No espectro de RMN de ^1H deste composto (Página 169), observou-se o multipeto entre 4,50 e 5,35 ppm referente ao hidrogênio do carbono ligado aos dois oxigênio do grupo THP e o singeto referente aos hidrogênios da metila do éster em 3,65 ppm.

Em seguida, foi realizada a etapa de redução do éster **4** com LiAlH_4 ⁹¹ para gerar o álcool intermediário chave **5** (95% de rendimento), que foi convertido para o mesilato **6** em 91% de rendimento. Embora o tempo de retenção na análise do produto **5** por CG tenha diminuído 0,5 min em relação ao éster **4** em coluna RTX-5, o espectro de massas ainda apresentava o fragmento m/z 85 (Página 170), confirmando que se tratava do produto protegido (**5**). O mesmo ocorreu com a análise cromatográfica do mesilato **6**, que aumentou cerca de 4 min em relação ao álcool. Nas análises de RMN do composto **5** foi possível observar o desaparecimento do singeto em 3,65 ppm, referente aos hidrogênios da metila do

éster no espectro de ^1H (Página 171), e do sinal em 173,6 ppm, referente ao carbono da carboxila no espectro de ^{13}C (Página 171).

O bloco B consistiu da bromação do 2-metilnonan-1-ol (**7**) com $\text{CBr}_4\text{-Ph}_3\text{P}$ para formação do 1-bromo-2-metilnonano (**8**) em 97% de rendimento. Na análise por CG-EM foi possível observar a presença de apenas um produto e seu espectro de massas (Página 172) apresentou os fragmentos característicos de brometos (fragmento e fragmento+2).⁵⁴

No bloco C, o tratamento do brometo **8** com magnésio metálico em THF promoveu o reagente de Grignard correspondente, que foi adicionado ao mesilato **6** em THF e utilizando Li_2CuCl_4 como catalisador. O produto do acoplamento foi hidrolisado sem prévia purificação para gerar o 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**) em 21% de rendimento, além de outros subprodutos decorrente da hidrólise do reagente de Grignard que não reagiu.

A grande similaridade entre os espectros de massas do álcool **9** e o feromônio (Figura 75) sugeriu que esta estrutura estava correta. Entretanto, a comparação dos tempos de retenção dos dois compostos em coluna RTX-5 provou que o 2,4,8-trimetiltetradecan-1-ol (**9**) não é a estrutura do feromônio sexual de *P. stictica* (Figura 76). O índice de Kovats encontrado para o álcool sintético **9** foi de 1915 em coluna RTX-5, quase 40 unidades a mais que o índice encontrado para o feromônio (1876).

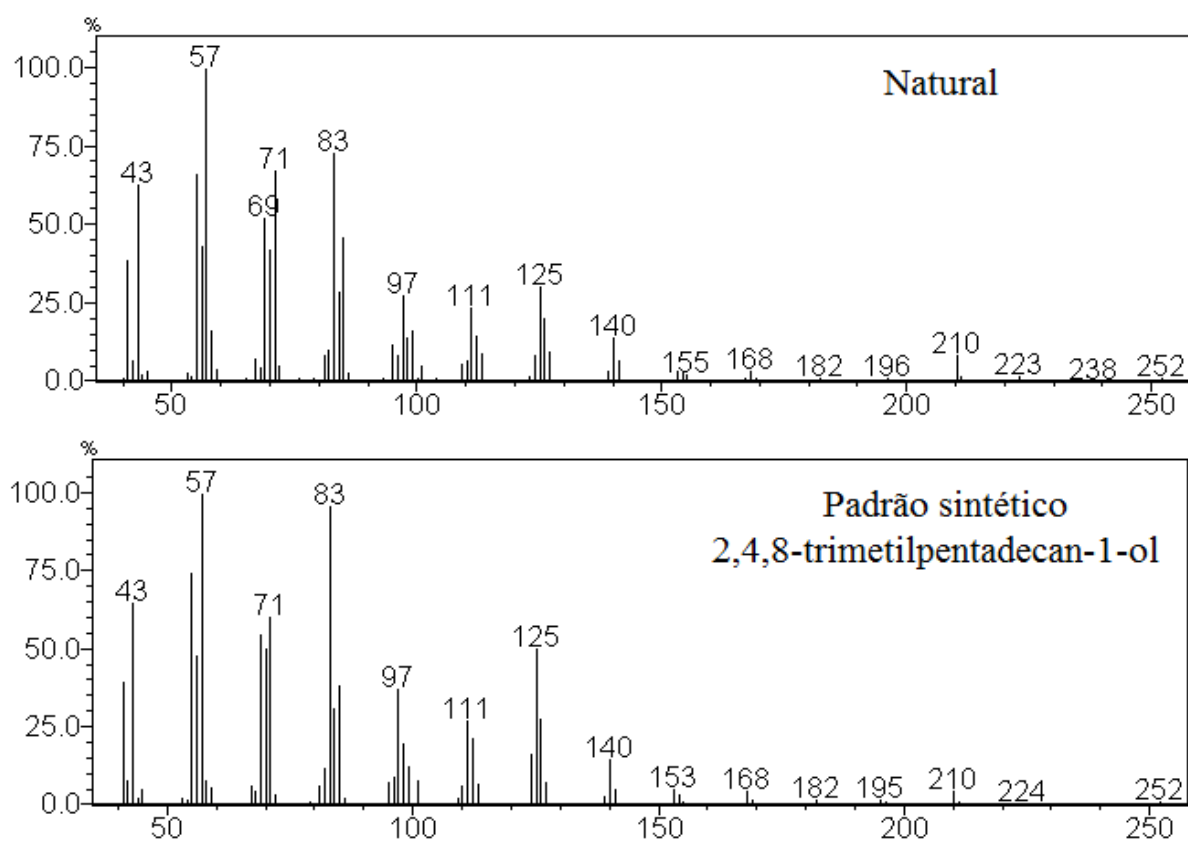


Figura 75. Espectros de massas do composto macho-específico produzido por *Pellaea stictica* e do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**).

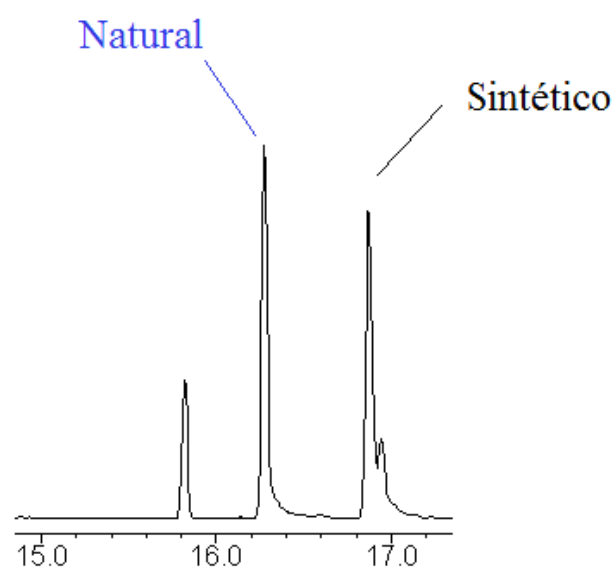


Figura 76. Comparação entre os tempos de retenção em coluna RTX-5 do composto produzido pelos machos de *Pellaea stictica* e do 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**).

Devido à grande diferença dos tempos de retenção do composto **9** e do feromônio, foi considerada a presença de 4 ramificações na cadeia carbônica. Com isso, os fragmentos presentes nos espectros de massas do hidrocarboneto e do deutereto (Figura 77) derivados do feromônio foram reavaliados no intuito de se atribuir uma nova estrutura química com 14 carbonos na cadeia principal e 4 metilas como ramificações.

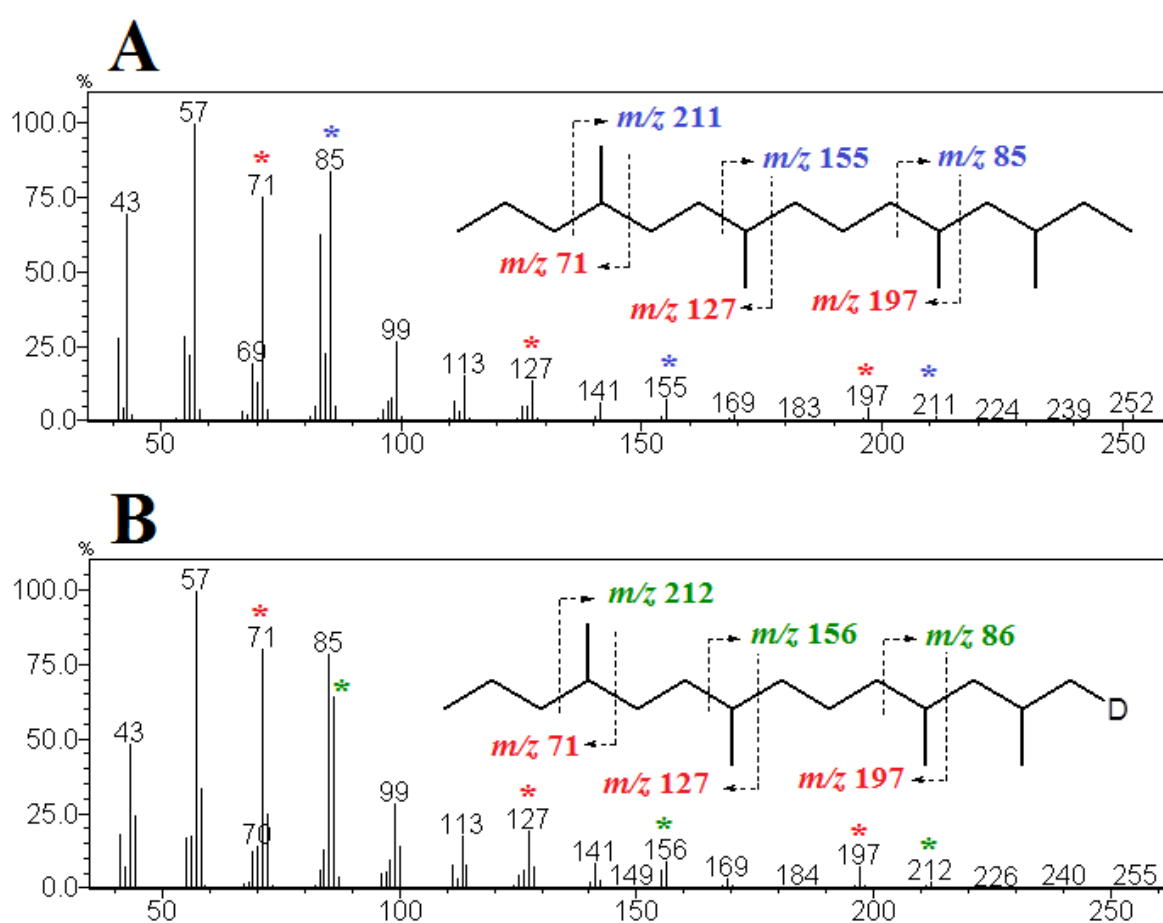


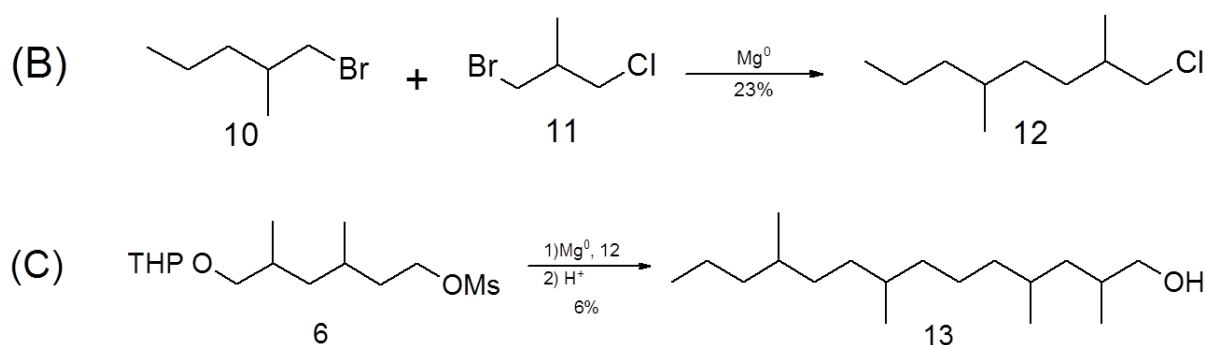
Figura 77. Espectros de massas do hidrocarboneto (A) e do deutereto (B) derivados do composto macho-específico produzido por *Pellaea stictica*.

Sendo o espectro de massas do álcool sintético **9** bastante similar ao feromônio, foram mantidas as posições das três metilas nos carbonos 2, 4 e 8. Com a nova análise, foi

observada a presença do fragmento m/z 211 no espectro do hidrocarboneto que deixa de existir no espectro do deutereto, dando lugar ao fragmento m/z 212. Estes dados sugeriram que a quarta metila estaria ligada ao carbono 11, o que levou à segunda proposta para a estrutura química do feromônio de *P. stictica* como sendo o 2,4,8,11-tetrametiltetradecan-1-ol.

Foi realizada, então, a síntese da segunda molécula proposta para confirmação da estrutura química atribuída ao composto natural. Como foram mantidas as posições das metilas em C2 e C4, o bloco A não foi alterado.

Para a síntese do bloco B (Esquema 3), o reagente de Grignard foi obtido a partir do 1-bromo-2-metilpentano (**10**), que foi acoplado com 1-bromo-3-cloro-2-metilpropano (**11**) na presença de Li_2CuCl_4 para formar o 1-cloro-2,5-dimetiloctano (**12**) (23% de rendimento). A formação do cloreto **12** foi verificada através do sinal em 52,5 ppm, referente ao carbono vizinho ao cloro no espectro de RMN de ^{13}C (Página 174) e do multiplete entre 3,35 e 3,53 ppm, no espectro de RMN de ^1H (Página 173).



Esquema 3. Rota sintética do 2,4,8,11-tetrametiltetradecan-1-ol (**13**).

As mesmas condições de reação do bloco C foram empregadas agora com o cloreto **12** no lugar do brometo **8**, sendo que o produto formado foi hidrolisado imediatamente para

gerar o 2,4,8,12-tetrametiltetradecan-1-ol (**13**) com 6% de rendimento. Com o produto final obtido, mesmo que em baixo rendimento, foi possível realizar a coinjeção do feromônio com o álcool sintético **13**. Verificou-se que novamente não se tratava da estrutura correta, pois não houve coeluição na análise por CG. Entretanto, os índices de Kovats tiveram valores bem aproximados com diferença de apenas 9 unidades, sendo 1867 para o álcool sintético **13** e 1876 para o feromônio.

O espectro de massas obtido da análise do álcool sintético **13** também apresentou grande similaridade ao do composto natural. Dessa forma, para melhor análise das posições das ramificações, foi realizada a derivatização de **13** para obtenção do hidrocarboneto e comparação dos tempos de retenção (Figura 78) e espectros de massas (Figura 79) com o hidrocarboneto derivado do natural. Com a comparação dos dois espectros, foi possível notar que a principal diferença se deu na intensidade relativa do fragmento m/z 71, relacionado à fragmentação que contém a metila no carbono 11, indicando que esta ramificação não estaria na posição correta.

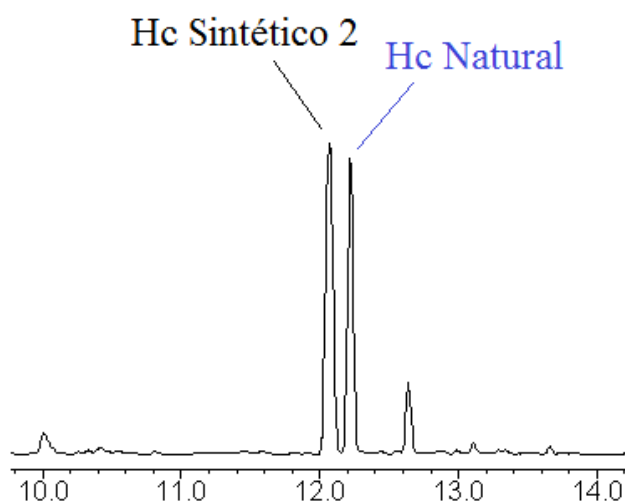


Figura 78. Cromatograma da coinjeção do hidrocarboneto (Hc) derivado do composto produzido pelos machos de *Pellaea stictica* e do 2,4,8,11-tetrametiltetradecano, em coluna RTX-5.

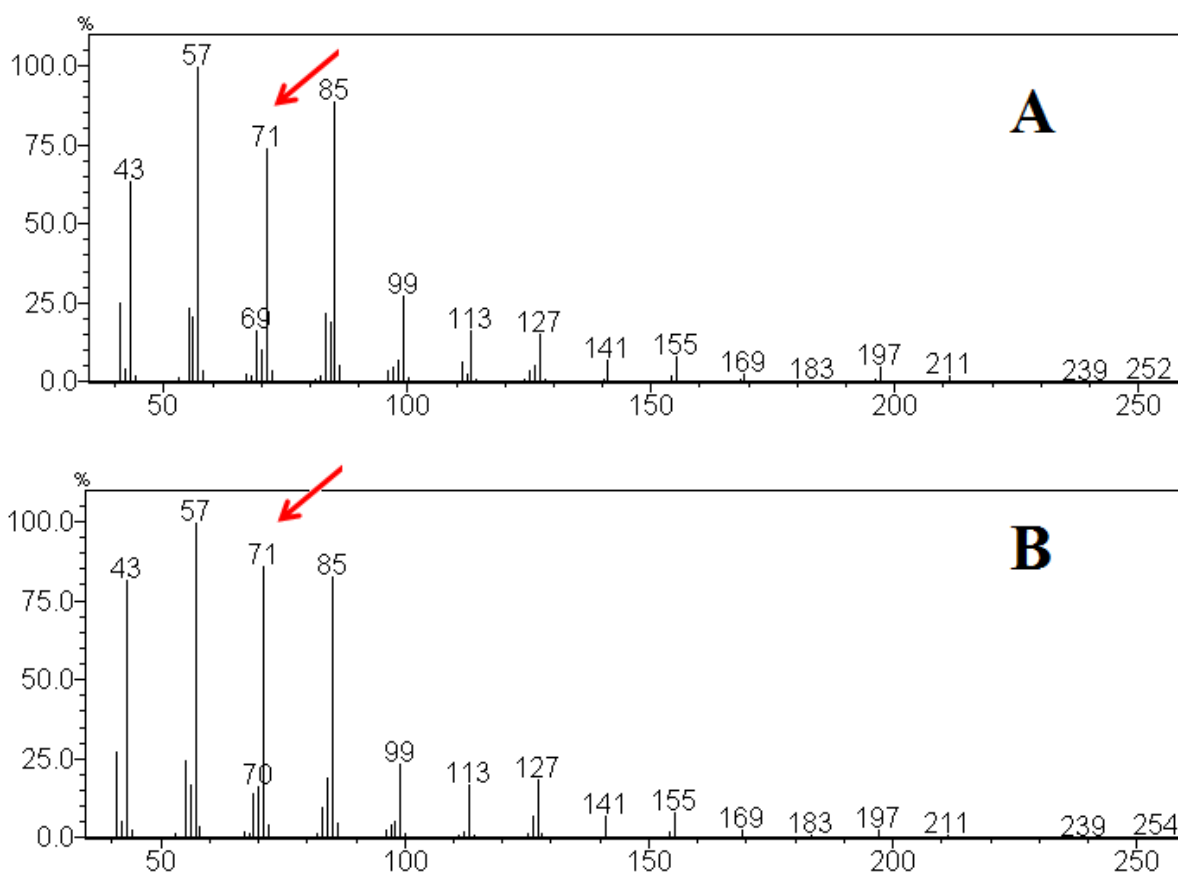


Figura 79. Espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica* (A) e do 2,4,8,11-tetrametiltetradecano (B).

A partir de outra avaliação do espectro do hidrocarboneto derivado do feromônio, observou-se que a diferença entre as intensidades relativas dos fragmentos m/z 43 e m/z 57 era maior do que em espectros de massas de hidrocarbonetos de cadeia linear, como o tridecano (Figura 80). Esta diferença também foi observada, porém mais intensamente, no espectro de massas do hidrocarboneto derivado do feromônio sexual de *P. macunaima* (Página 102) e era relativa à uma ramificação metílica posicionada no carbono 13.

Com isso, a terceira proposta estrutural do composto macho-específico produzido por *P. stictica* foi o 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol.

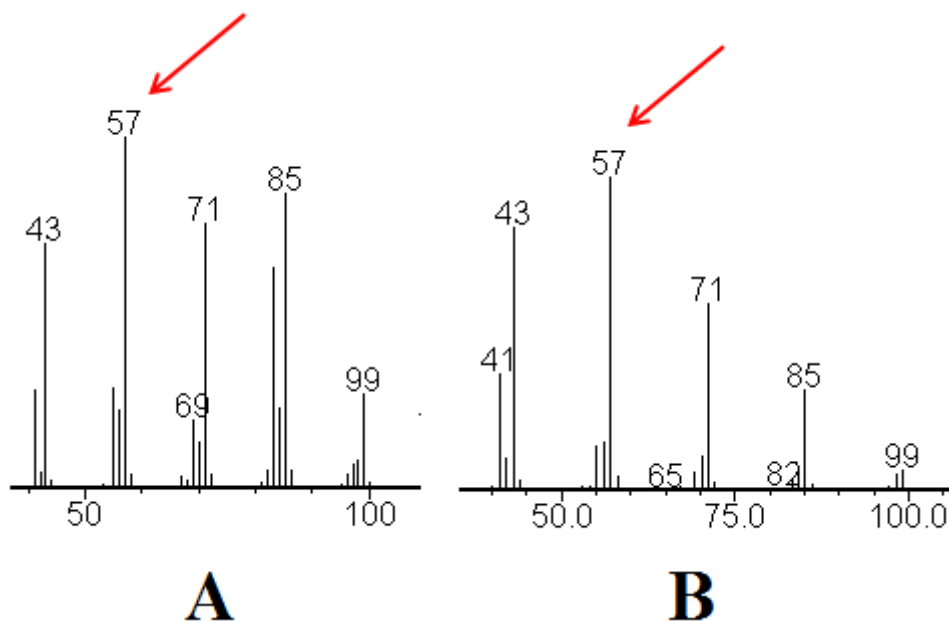
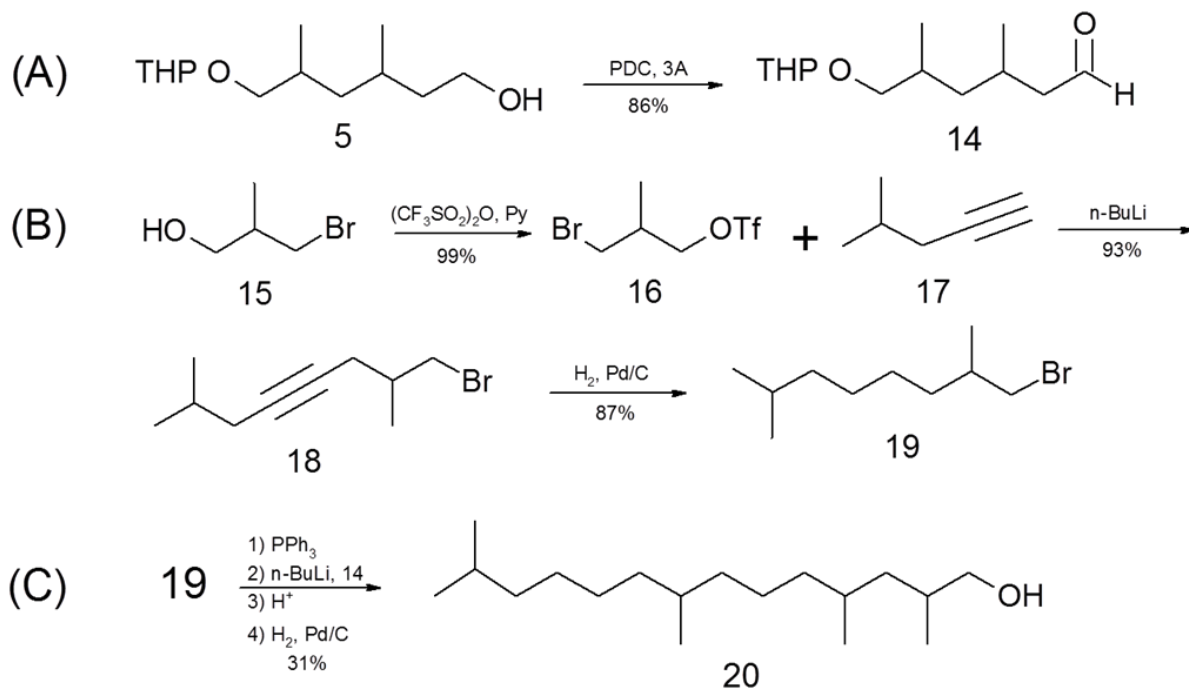


Figura 80. Comparação entre a intensidade relativa do fragmento m/z 57 nos espectros de massas do hidrocarboneto derivado do composto macho-específico de *Pellaea stictica* (A) e do tridecano (B).

Para síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**), foram necessárias algumas mudanças na rota sintética utilizada para os alcoóis anteriores, como pode ser observado no Esquema 4.

No bloco A, foi realizada a oxidação com PCC do álcool intermediário **5** para obtenção do aldeído **14** com 86% de rendimento. A formação do produto foi comprovada por análises de RMN as quais mostraram o aparecimento de um tripleto em 9,75 ppm no espectro de ^1H (Página 175) relativo ao hidrogênio ligado a carbonila e um sinal em 203,2 ppm no espectro de ^{13}C (Página 176) referente ao carbono carbonílico.



Esquema 4. Rota sintética do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

O bloco B iniciou-se com a síntese do bromotriflato **16** a partir do 3-bromo-2-metilpropan-1-ol (**15**), em rendimento quantitativo. O produto foi caracterizado por RMN de ^1H (Página 177), que apresentou um dubleto em 4,53 ppm relativo aos hidrogênios ligado ao carbono vizinho ao oxigênio e por RMN de ^{13}C (Página 178), que apresentou dois sinais em 117,2 e 120,4 ppm referentes ao carbono ligado aos átomos de flúor.

O bromotriflato **16** foi tratado com 4-metil-1-pentinil-lítio a 0°C por 1 h em THF levando ao 1-bromo-2,7-dimetil-4-octino (**18**) com 93% de rendimento. A formação do brometo **18** foi evidenciada através do desaparecimento dos sinais em 117,2 e 120,4 ppm e o aparecimento dos sinais em 81,3 e 78,0 ppm referentes aos carbonos *sp* no espectro de RMN de ^{13}C (Página 180), e o desaparecimento do dubleto em 4,53 ppm, no espectro de RMN de ^1H (Página 179). Em seguida, o brometo **18** foi hidrogenado ao bromoalcano correspondente **19** (87% de rendimento),

A partir do brometo **19**, foi gerado o sal de fosfônio correspondente para que fosse acoplado ao aldeído **14** através de reação de Wittig. Esta reação foi escolhida no intuito de se obter o produto com maior rendimento, devido aos baixos rendimentos obtidos quando a reação de Grignard foi empregada. O objetivo foi alcançado e o produto **20** foi obtido com 38% de rendimento, que em seguida foi hidrogenado com Pd/C e desprotegido, levando à formação do produto final desejado, o 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

Foi verificada a coeluição em 3 colunas cromatográficas distintas (RTX-5; EC-WAX e EC-1) do feromônio com o álcool **20**, e o espectro de massas da terceira molécula proposta foi idêntico ao natural, como pode ser observado na Figura 81. Com estes dados, foi possível confirmar a estrutura química do feromônio sexual de *P. stictica* como sendo o 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

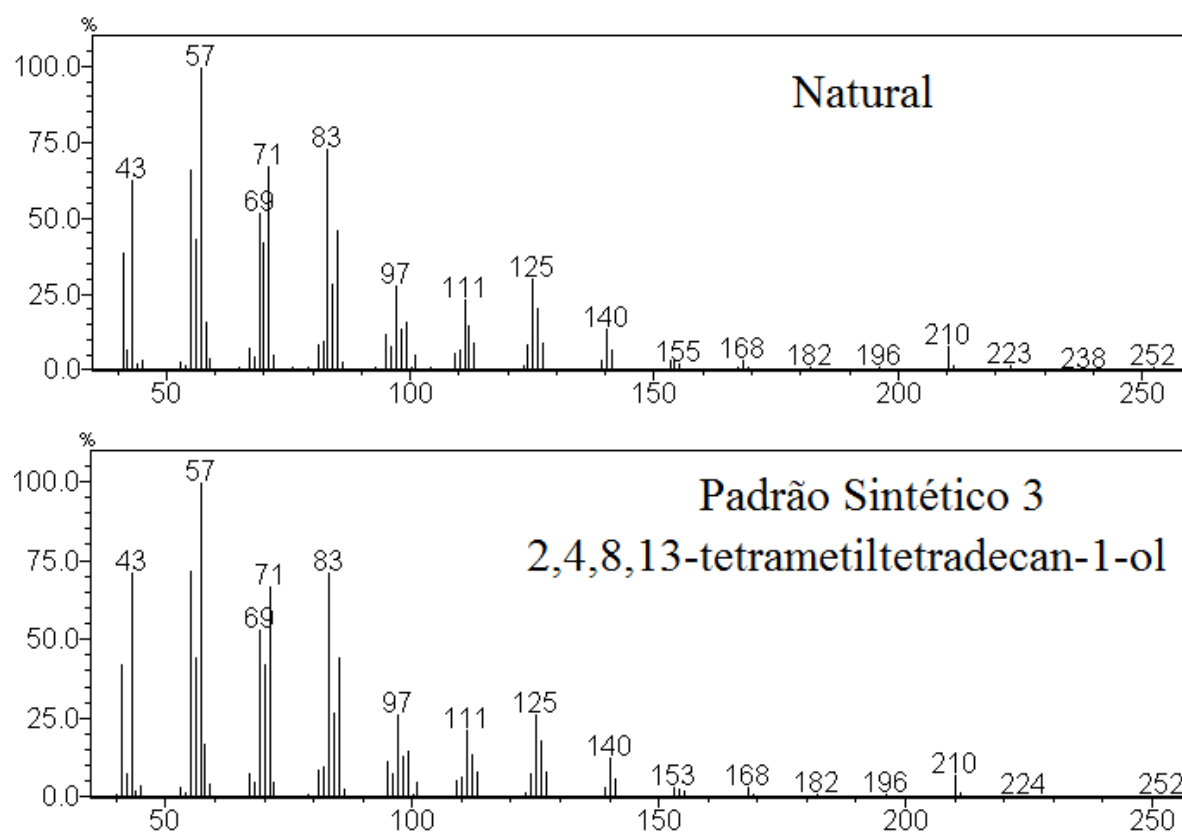


Figura 81. Espectros de massas do feromônio de *Pellaea stictica* e do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

Em posse do composto sintético macho-específico, serão iniciadas as análises com CG-EAG e olfatômetro de dupla-escolha para testar a atividade biológica que o álcool **20** exerce sobre os indivíduos da espécie *P. stictica*.

2.4.3. *Agroecus griseus*



Figura 82. Exemplar de adulto da espécie *Agroecus griseus*.

A comparação dos cromatogramas dos extratos de voláteis coletados de adultos machos e fêmeas *A. griseus* (Figura 82) mostrou a presença de um composto produzido apenas pelos machos, além de outros compostos que são comuns para ambos os sexos (Figura 83). O Índice de Kovats deste composto foi calculado para duas diferentes colunas, para RTX-WAX, a qual apresentou valor de 1889, e para RTX-5, com valor de 1752.

Os testes de eletrofisiologia utilizando o extrato da aeração dos machos com antenas de machos e fêmeas indicaram que, de todos os componentes do extrato, apenas o composto macho-específico provocou perturbação da antena (Figura 84), sugerindo a possibilidade de este composto atuar como feromônio sexual para esta espécie.

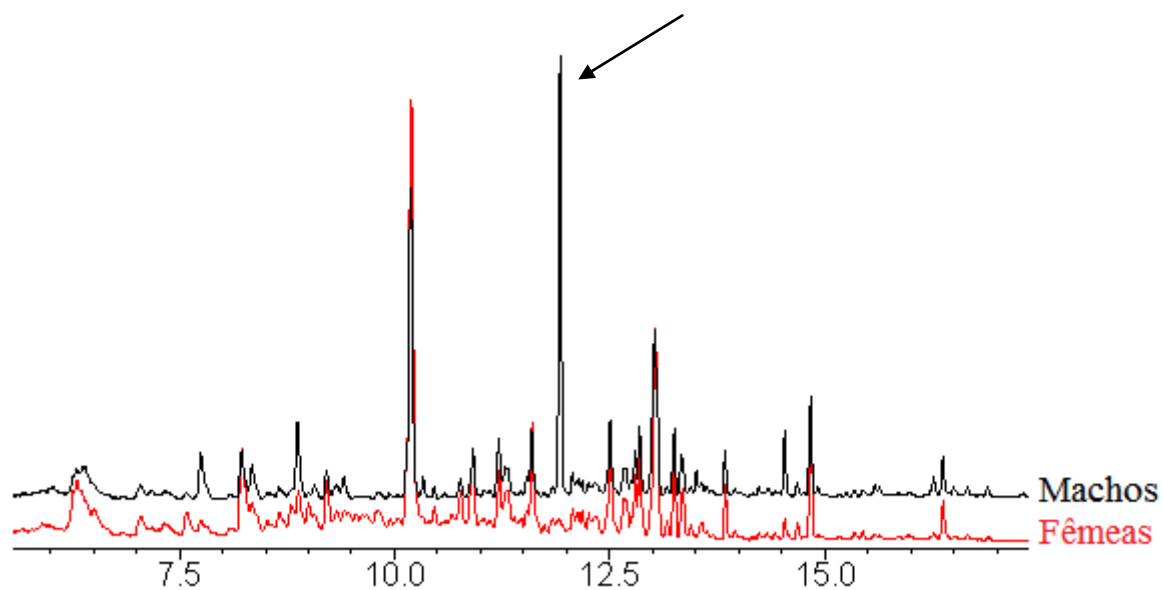


Figura 83. Análises cromatográficas dos voláteis produzidos por machos e fêmeas *Agroecus griseus*, com destaque para o composto produzido exclusivamente pelos machos. Programa de temperatura utilizado: 100°C por 1min, aumentando 10°C / min até 250 e permanecendo a esta temperatura por 10 min.

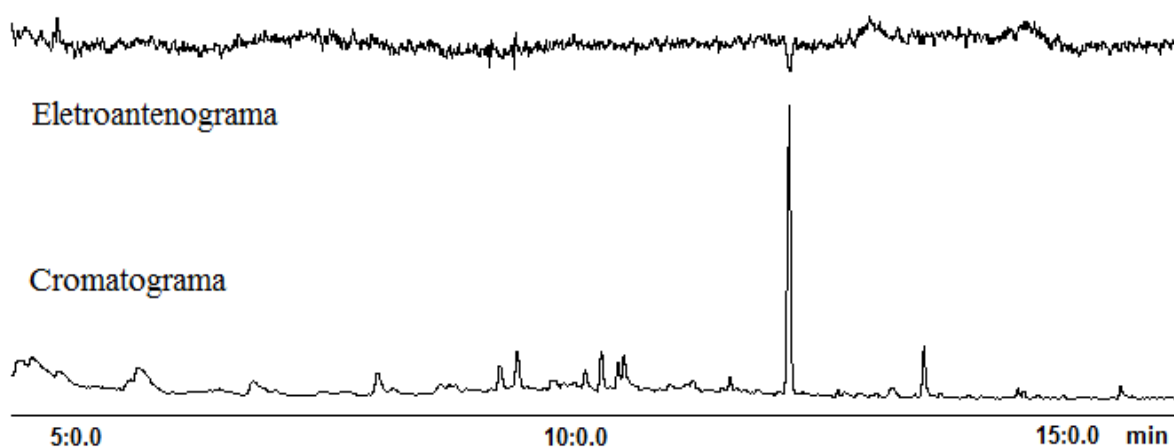


Figura 84. Resposta de antena de fêmea *Agroecus griseus* em análises de CG-EAG utilizando extrato dos voláteis de machos.

Para a elucidação estrutural do feromônio de *A. griseus*, foram realizadas análises dos extratos por CG-EM E CG-IVTF. O espectro de infravermelho (Figura 85) exibiu uma banda em 1741 cm^{-1} , referente ao estiramento C=O característico de ésteres, e duas outras bandas em 1171 cm^{-1} e 1199 cm^{-1} , relativo ao estiramento C-C-O desta função.⁵⁵

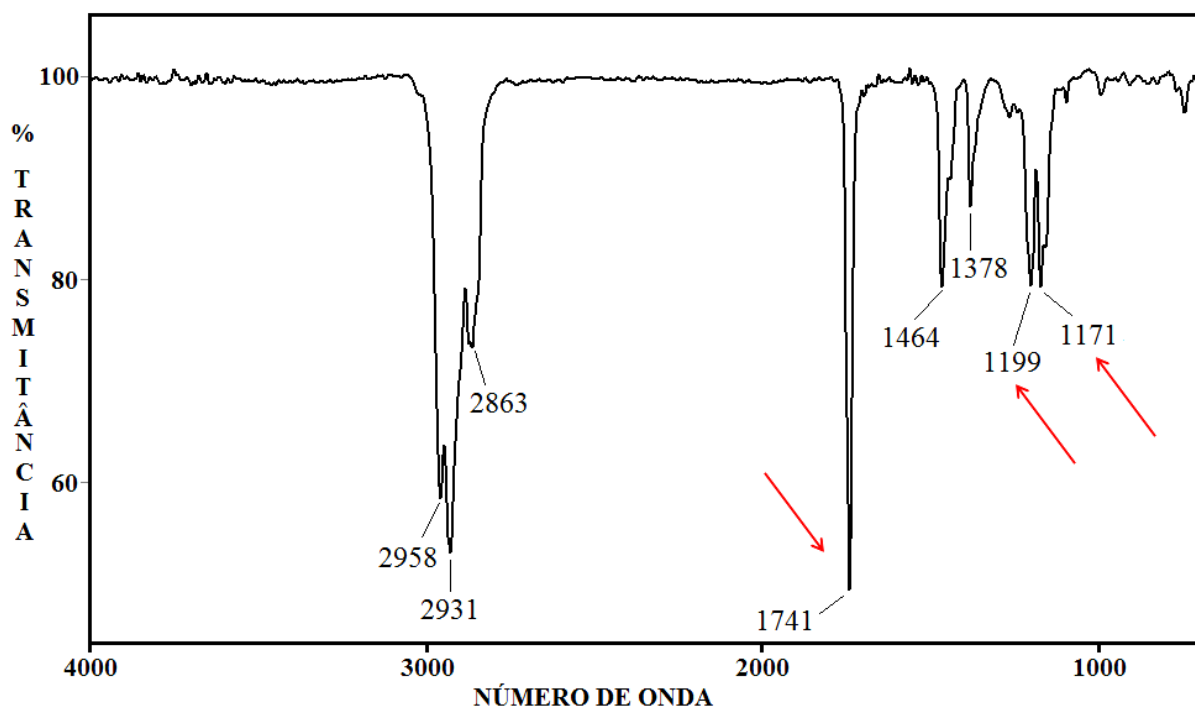


Figura 85. Espectro de infravermelho do composto macho-específico de *Agroecus griseus*.

Dentre os principais fragmentos encontrados no espectro de massas (Figura 86), destaca-se o do íon molecular em m/z 270, pico base em m/z 88 e um segundo pico de maior intensidade em m/z 101, fragmentos característicos atribuídos à presença de ramificação metila ligada ao carbono α à carboxila de um éster metílico. Também é possível observar dois picos em m/z 157 e m/z 127 que se sobrepõem em intensidade aos picos anteriores e sugerem a presença de outras duas ramificações metilas.⁵⁴ Este mesmo padrão de fragmentação já foi descrito anteriormente para o composto 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, componente do feromônio sexual de *Euschistus heros*⁷⁴ e *Euschistus obscurus*⁹².

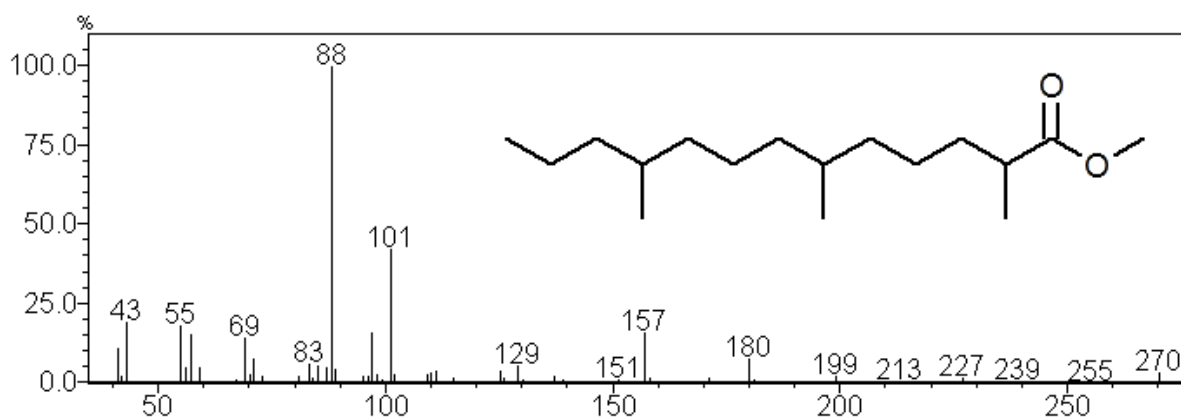


Figura 86. Espectro de massas do composto macho-específico de *Agroecus griseus*.

Foi realizada a coinjeção do composto sintético racêmico, sintetizada previamente por Zarbin e colaboradores⁸⁹, com o extrato dos voláteis dos machos e houve a coeluição com o composto macho-específico em duas diferentes colunas, a RTX-5 e a RTX-WAX. Os espectros de massas e infravermelho do composto sintético se mostrou idêntico ao natural, confirmando o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila como estrutura química do composto produzido exclusivamente pelos machos *A. griseus*.

Para checar a atividade biológica do composto sintético, foram realizadas análises com CG-EAG e testes comportamentais com machos e fêmeas *A. griseus*, utilizando um olfatômetro em forma de Y. Como pode ser observado na Figura 87, o composto sintético é capaz de provocar um distúrbio no sinal apenas das antenas de fêmeas, tal qual o composto natural.

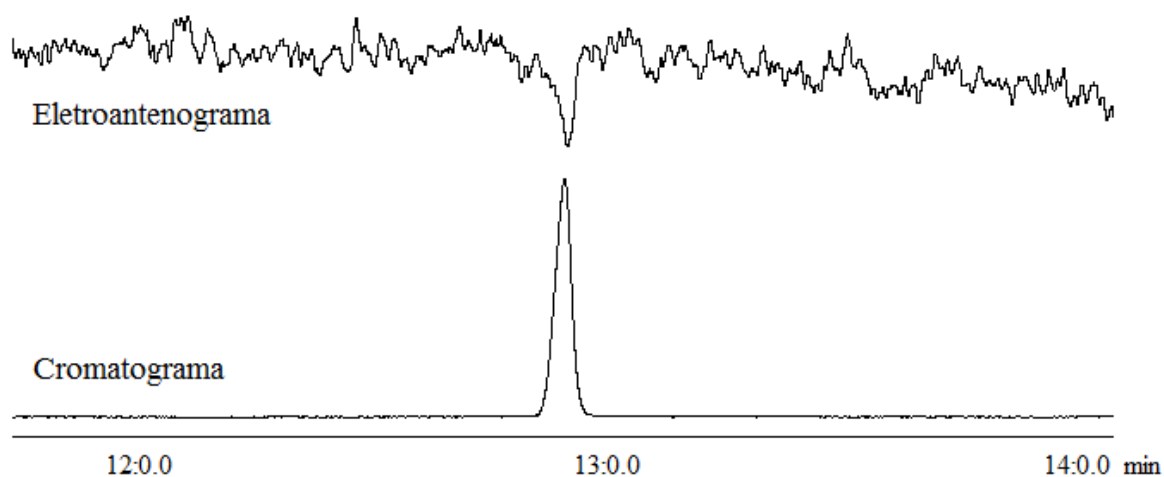


Figura 87. Resposta da antena de *Agroecus griseus* fêmea para o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila.

Na Figura 88 é mostrado que a solução do composto sintético em hexano é bastante atrativa para as fêmeas quando testado contra o solvente utilizado na solução (controle). Entretanto, os machos não se manifestaram frente ao feromônio sintético, nem positiva ou negativamente.

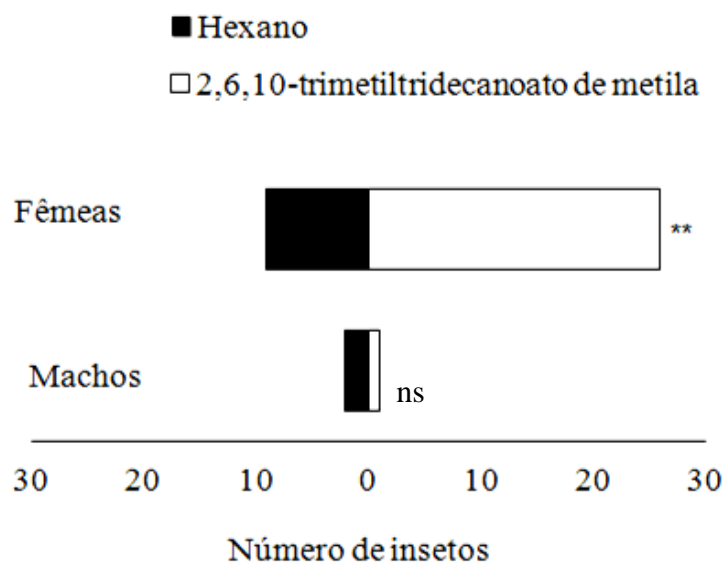


Figura 88. Resultados dos testes de dupla escolha feitos em olfatômetro em Y com insetos machos (10 insetos utilizados, 3 respostas) e fêmeas (40 insetos utilizados, 35 respostas) *Agroecus griseus*, testando a atratividade do 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila vs. controle (hexano). Teste de Qui-quadrado, $P < 0,001$.

Devido aos resultados obtidos dos bioensaios com o padrão sintético serem similares ao composto natural, foi possível determinar o 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila como a estrutura química do feromônio sexual de *A. griseus*.

2.5. DISCUSSÃO

Nas análises dos voláteis produzidos por *Pallantia macunaima* foi encontrado um único composto macho-específico, o qual, através de testes comportamentais e análises de eletroantenografia, provou ser o feromônio sexual para esta espécie. Análises por CG-EM e CG-IVTF do extrato natural e seus respectivos álcool, éter trimetilsilílico, hidrocarboneto e deutereto derivados, sugeriram a estrutura química para o feromônio como sendo uma cetona com cadeia carbônica contendo ramificações metílicas.

No entanto, apenas após a síntese de duas estruturas químicas (6,10-dimetilpentadecan-2-ona e 6,10,12-trimetiltetradecan-2-ona), cujos espectros de massas se mostraram bastante similares ao do composto natural, foi possível se determinar a estrutura química racêmica do feromônio como sendo a 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona. A função biológica deste composto sintético foi comprovada a partir da forte atratividade que ele exerceu sobre as fêmeas de *P. macunaima*, nos testes de comportamento realizados em laboratório.

É a primeira vez que uma cetona é descrita como feromônio sexual para percevejos. Entretanto, uma estrutura química com 14 carbonos na cadeia principal e três metilas nas posições 6, 10 e 13 já foi descrita para outro percevejo. Aldrich e colaboradores⁹³ identificaram o feromônio de agregação do percevejo predador *Stiretrus anchorago* como sendo o 6,10,13-trimetiltetradecan-1-ol.

Também foi encontrado um único composto macho-específico nos voláteis liberados por *Pellaea stictica* que, através dos testes biológicos, mostrou ser o feromônio sexual desta espécie. As análises da dinâmica de emissão do feromônio mostrou que este composto é liberado preferencialmente na fotofase. Estes resultados então de acordo com os descritos por Rodrigues, o qual observou que o comportamento de acasalamento desta espécie ocorre na

fotofase, mais precisamente nas primeiras e últimas horas de luz.²² Da mesma forma que ocorreu para *P. macunaima*, mesmo através da análise dos espectros de massas de vários produtos da derivatização do composto natural (éter trimetilsilílico, ácido carboxílico, éster metílico, hidrocarboneto e deutereto), não foi possível se determinar a estrutura correta de imediato. Foram necessárias as sínteses de dois outros compostos de estrutura semelhantes, o 2,4,8-trimetilpentadecan-1-ol (**9**) e o 2,4,8,11-tetrametiltetradecan-1-ol (**13**), para se atribuir a estrutura química do feromônio de *P. stictica* como sendo o 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (**20**).

A síntese desses três álcoois envolveu um total de 19 diferentes etapas e 8 compostos nunca sintetizados anteriormente. O material de partida foi o mesmo (bloco A), sendo empregada a oxidação de Baeyer Villiger da 3,5-dimetil-ciclohexanona (**1**), a qual ocorreu a inserção de um oxigênio do peróxido, seguida da clivagem da ligação e migração do carbono adjacente à carbonila por processo concertado.

Como reação de acoplamento entre os blocos B e C para a construção dos álcoois **9** e **13**, foi escolhida a reação de Grignard. Nesta reação, o reagente de Grignard atua como nucleófilo, atacando o carbono de maior caráter eletrofílico, que é o carbono ligado ao oxigênio.⁹⁴ Esta reação requer cuidados como atmosfera inerte e ambiente reacional livre de água, pois estas condições destroem rapidamente o reagente por protonólise ou oxidação.

O emprego da reação de Grignard gerou produtos com baixo rendimento, porém em quantidades suficiente para a coinjeção com o feromônio natural. Como o objetivo era determinar a estrutura química do composto natural e obter quantidades necessárias para análises químicas e testes biológicos, não houve uma preocupação com a otimização dos procedimentos das reações para a obtenção de maiores rendimentos.

No entanto, para a síntese do álcool **20**, foi escolhida a reação de Wittig como metodologia para reação de acoplamento dos blocos B e C, no intuito de se obter melhor

rendimento. O objetivo foi alcançado, pois o álcool **20** foi obtido em maior rendimento total (22%) se comparado com os álcoois 9 (16%) e 13 (4%).

Como etapas futuras do estudo do feromônio sexual de *P. stictica*, serão realizados os testes eletrofisiológicos, com o CG-EAG, e de atratividade para a avaliação do potencial biológico deste feromônio sintético.

Já o feromônio sexual de *Agorecus griseus* foi identificado como 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, molécula já descrita como componente do feromônio sexual de dois outros percevejos do gênero *Euschistus*. Semelhanças entre os gêneros *Agroecus* e *Euchistus* já haviam sido reportadas, mas apenas a caráter morfológico.¹⁸ Entretanto, é comum encontrar compostos que se repetem na mistura feromonal de insetos de diferentes ordens. Por exemplo, os compostos *cis* e *trans*-1,2-epoxi-Z-alfa-bisabolenos ((Z)-(1S,3R,4S)-)-2-(3,4-epoxi-4-metilciclohexil)-6-metilhepta-2,5-dieno) estão presentes no feromônio sexual de duas espécies do gênero *Nezara* (*N. viridula* e *N. antennata*) e quatro do gênero *Acrosteanum* (*A. aseedum*, *A. hilare*, *A. marginatum* e *A. pennsylvanicum*).¹¹

O 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila foi sintetizado pela primeira vez por Mori e Murata⁹⁵, empregando a clivagem do ciclopropano por Rearranjo de Julia como reação chave para esta síntese. Em seguida, os mesmos autores apresentaram a síntese dos oito possíveis estereoisômeros deste composto⁹⁶. Então, Zarbin e colaboradores⁸⁹ descreveram uma rota sintética alternativa para este composto, e este padrão sintético teve sua atividade biológica confirmada para as fêmeas de *A. griseus*, através de testes de laboratório.

Em Pentatomidae, insetos individuais ou em grupos com um número reduzido de insetos, muitas vezes liberam mais compostos macho-específicos durante a aeração do que grupos maiores.⁹⁷⁻⁹⁸ Por exemplo, quando o percevejo *Murgantia histrionica* foi aerado, individualmente ou em grupos de cinco insetos, os machos liberaram quantidades mais elevadas de compostos macho-específicos do que quando em grupos de dez ou mais

indivíduos.⁹⁸ Por esse motivo, nas aerações realizadas neste trabalho, foram utilizados grupos de cinco indivíduos por câmaras, gerando extratos bastante limpos (com pouca ou nenhuma presença de compostos defensivos) e com grande quantidade dos compostos macho-específicos. Foi sugerido que os machos podem detectar a presença de outros machos, o que influencia as taxas de liberação de feromônios.⁹⁸

Igualmente verificado nos resultados da dinâmica de emissão dos compostos macho-específicos das espécies *P. macunaima* e *P. stictica*, insetos da espécie *M. histrionica* produzem o feromônio sexual principalmente durante toda a fotofase.⁹⁸ No entanto, a atividade reprodutiva da maioria dos pentatomídeos fitófagos estudados ocorre durante o final da tarde e início da noite (por exemplo, o gênero *Chlorochroa*,^{40, 78, 99} *N. viridula*¹⁰⁰, *E. heros*³⁰ e *T. pallidovirens*¹⁰¹). Por esse motivo, os bioensaios com os feromônios naturais e sintéticos foram realizados no final da tarde, gerando resultados bastante satisfatórios nos testes de atratividade.

Mesmo que produzidos principalmente na fotofase, os compostos macho-específicos também foram detectados na escotofase. Este fato sugere que os compostos foram produzidos de forma contínua, apenas variando a taxa de produção, ou que os compostos foram adsorvidos sobre a cutícula e liberados lentamente. Este padrão pode ter se desenvolvido por várias possíveis razões. Primeiro, os parasitóides de percevejos utilizam os compostos produzidos pelos machos como cairomônios,¹⁰² e pico de produção destes compostos nas horas mais frias do dia e com diminuição dos níveis de luz, podem ajudar os insetos a evitar de ser parasitados.¹⁰³ Segundo, por causa do período de cópula ser relativamente longo, os insetos que estão copulando podem estar em maior risco de predação, sendo que o pico de produção no final da tarde e começo da noite pode ser programado de modo que machos e fêmeas se encontram ao anoitecer e depois continuam a cópula sob a proteção da escuridão. E

em terceiro, o pico de produção de feromônio de pico e o acasalamento pode ser programado para uma temperatura e umidade ideal.⁷⁸

Até agora, todos os estudos com feromônios sexuais ou de agregação produzidos por Pentatomidae, incluindo os resultados obtidos neste trabalho, têm demonstrado que os machos são responsáveis pela liberação dos voláteis de atratividade.²⁷ Em seguida, na mesma planta, os insetos de ambos os sexos emitem sinais vibratórios que são usados na comunicação à curta distância para localizar o parceiro para acasalamento.¹⁰⁴

Há algumas possíveis explicações por os machos serem responsáveis pela liberação destes compostos, mas até agora nenhuma foi confirmada. Uma delas é que os insetos machos são os responsáveis pelo processo de recolonização, característicos de muitas espécies de Heteropteras. Um exemplo é o percevejo *Podisus maculiventris*, em que os machos procuram primeiro por sítios de alimentação e, então, chamam as fêmeas para o novo habitat através da liberação de feromônios. Outra explicação seria que, enquanto os feromônios liberados pelos percevejos são utilizados por seus parasitoides e predadores como localizador¹⁰² e as fêmeas necessitam de intervalos de tempo para pôr ovos e, conseqüentemente, maior longevidade, é melhor que sejam os machos a correr o risco de ser o produtor de feromônio, já que eles necessitam de pouco tempo de vida para acasalar uma ou mais vezes.⁴⁰

Os três compostos macho-específicos identificados neste trabalho possuem isômeros e a importância da quiralidade sobre a bioatividade de um composto, como os feromônios de insetos, já foi descrita anteriormente.¹⁰⁵ Embora a mistura de todos os oito isômeros do feromônio de *Eeuchistus heros* mostrou atratividade para as fêmeas desta espécie, o isômero (2*R*, 6*R*, 10*S*)-trimetiltridecanoato de metila demonstrou ser mais eficaz do que a mistura estereoisomérica, em bioensaios com olfatômetro.¹⁰⁶ Fêmeas de *A. griseus* e *P. macunaima* também foram atraídas para a mistura racêmica de seus respectivos feromônios sintéticos.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, todos os 19 componentes encontrados nas glândulas produtoras dos compostos defensivos liberados pelos percevejos *Pallantia macunaima*, *Pellaea stictica* e *Agroecus griseus*, tiveram suas estruturas químicas elucidadas. A maioria dos compostos encontrados foi semelhante aos de outras espécies de Pentatomidae, sendo eles hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, oxo-alcenais e ésteres. No entanto, apesar do grande número de trabalhos sobre compostos defensivos de percevejos, dois compostos presentes na MTG de *A. griseus* nunca foram descritos anteriormente para esta família, o acetato de (*S*)-2-metilbutila e acetato de 3-metil-2-butenila.

Os cinco ínstaes da fase ninfal apresentaram proporções significativamente diferentes destes compostos na mistura feromonal, principalmente entre o primeiro instar e os demais. Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na proporção dos compostos presentes na MTG entre adultos machos e fêmeas. Já no estudo com insetos adultos de diferentes idades das espécies *P. macunaima* e *P. stictica* (10, 20 e 30 dias), foram verificadas variações nas proporções de alguns compostos presentes no conteúdo da MTG conforme o aumento da idade adulta, provavelmente relacionadas ao amadurecimento do organismo destes insetos que se inicia por volta dos 10 dias. Com isso, a necessidade da descrição da idade adulta em estudos com a MTG foi demonstrada, dado que não apresentava relevante importância nos trabalhos publicados até então.

Este trabalho também visou à identificação do feromônio sexual de *P. macunaima*, *P. stictica* e *A. griseus*. Análises cromatográficas dos voláteis liberados por estas três espécies mostraram que os machos de cada espécie produzem um composto que é responsável pela atração das fêmeas para o acasalamento. A partir de análises de CG-EM e CG-IVTF dos compostos naturais e seus derivados, foi sugerida uma cetona com ramificações metílicas na

cadeia carbônica como estrutura química do composto macho-específico de *P. macunaima* e um álcool com ramificações metílicas para *P. stictica*. Após a síntese de três diferentes estruturas propostas para cada composto natural, estas moléculas foram identificadas como 6,10,13-trimetiltetradecan-2-ona e 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol, respectivamente. Bioensaios com olfatômetro em Y demonstraram que as fêmeas de *P. macunaima* são atraídas para a cetona sintética, tornando-se possível confirmar a atividade biológica deste composto. Para *P. stictica*, a atividade biológica do álcool sintético ainda será verificada.

O composto macho-específico de *A. griseus* foi identificado como 2,6,10-trimetiltridecanoato de metila, um componente previamente identificado do feromônio sexual de *Euschistus heros* e *E. obscurus*. Bioensaios com olfatômetro em Y mostraram que o padrão sintético foi fortemente atrativo para as fêmeas de *A. griseus*, e testes com CG-EAG provocaram respostas das antenas das fêmeas, tal qual o feromônio natural.

É importante destacar que, apesar de os testes biológicos para os feromônios sintéticos racêmicos apresentarem resultados promissores, é necessário realizar a síntese de todos os possíveis isômeros de cada feromônio e testes comportamentais, para verificar se algum isômero específico é mais atrativo do que a mistura racêmica.

A partir dos resultados deste trabalho, está aberta a possibilidade de desenvolvimento de armadilhas para monitoramento e controle destas espécies no campo, utilizando estes feromônios sintéticos como iscas. Além disso, este trabalho contribuiu significativamente para o meio acadêmico, disponibilizando metodologias detalhadas e um grande banco de dados de espectros de massas e infravermelho para auxiliar a pesquisa com feromônios de insetos, área que está em evidente expansão nos dias atuais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Navarro, D. M. d. A. F.; Murta, M. M.; Duarte, A. G.; Lima, I. S. d.; Nascimento, R. R. d.; Sant'Ana, A. E. G., Aspectos práticos relacionados ao uso do Rincoforol, o feromônio de agregação da Broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro: análise de sua eficiência em campo. *Química Nova* **2002**, 25, 32-36.
2. Zarbin, P. H. G.; Lorini, L. M.; Ambroggi, B. G.; Vidal, D. M.; Lima, E. R., Sex pheromone of *Lononia obliqua*: Daily rhythm of production, identification, and synthesis. *J. Chem. Ecol.* **2007**, 33, 555-565.
3. Zarbin, P. H. G.; Ferreira, J. T. B.; Leal, W. S., Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônios de insetos. *Quím. Nova* **1999**, 22, 263-268.
4. Zarbin, P. H. G.; Rodrigues, M. A. C. M.; Lima, E. R., Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quím. Nova* **2009**, 32, 722-731.
5. Vilela, E. F.; Della Lucia, T. M. C., *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 2 ed.; Holos: Ribeirão Preto, 2001; p 206.
6. Butenandt, A.; Beckmenn, R.; Stramm, D.; Hecker, E., Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforschg.* **1959**, 14B, 283-284.
7. Corazza, S., *Aromacologia*. SENAC SAO PAULO.
8. Zarbin, P. H. G.; Rodrigues, M. A. C. M.; Lima, E. R., Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Química Nova* **2009**, 32, 722-731.

9. Moraes, C. B., *Metodologia para estudos de semioquímicos e a sua aplicação no manejo de pragas. A influência de voláteis de soja no comportamento do parasitóide Telenomus podisi*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: 2003.
10. Bergmann, J.; Villar, J. A. F. P.; Flores, M. F.; Zarbin, P. H. G., Synthesis of Pheromones: Highlights from 2005-2007. *Current Organic Chemistry* **2009**, 13, 683-719.
11. Millar, J. G., Pheromones of true bugs. *Top. Curr. Chem.* **2005**, 240, 37-84.
12. Zarbin, P. H. G.; Fávaro, C. F.; Vidal, D. M.; Rodrigues, M. A. C. M., Male-produced sex pheromone of the stink bug *Edessa meditabunda* (Heteroptera: Pentatomidae). **2012**, in press.
13. Zarbin, P. H. G.; Villar, J. A. F. P.; Marchi, I.; Bergmann, J.; Oliveira, A. R. M., Synthesis of Pheromones: Highlights from 2002-2004. *Current Organic Chemistry* **2009**, 13, 299-338.
14. Grazia, J.; Fortes, N. D. F.; Campos, L. A., Superfamília Pentatomoidea. In *Invertebrados Terrestres - Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do conhecimento ao final do século XXI.*, 1 ed.; Brandão, C. R. F.; Cancellato, E. M., Eds. FAPESP: São Paulo, 1999; Vol. 5, pp 101 - 112.
15. Aldrich, J. R., Chemical ecology of the Heteroptera. *Annu. Rev. Entomol.* **1988**, 33, 211-238.
16. Siqueira, F. Adição de frutos de *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae) em dieta artificial seca para a criação do percevejo marrom *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2007.
17. Gassen, D. N., *Manejo de pragas associadas a cultura do milho*. Aldeia Norte: Passo Fundo, 1996; p 134.

18. Rider, D. A.; Rolston, L. H., Review of the genus *Agroecus* Dallas, with the description of a new species (Hemiptera: Pentatomidae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* **1987**, 95, 428-439.
19. Grazia, J., Revisão do gênero *Pallantia* Stål, 1862 (Heteroptera, Pentatomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **1980**, 24, 15-27.
20. Panizzi, A. R.; Grazia, J., Stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) and an unique host plant in the Brazilian subtropics. *Iheringia. Série Zoologia* **2001**, 21-35.
21. Grazia, J.; Frey-da-Silva, A., Description of immatures of *Loxa deducta* Walker and *Pallantia macunaima* Grazia (Heteroptera: Pentatomidae) on privet, *Ligustrum lucidum* Ait. *Neotrop. Entomol.* **2001**, 30, 73-80.
22. Rodrigues, M. A. C. M. Biologia e ecologia química de percevejos neotropicais (Heteroptera: Pentatomidae, Coreidae). Tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
23. Henry, T. J., New United States Records for two Heteroptera: *Pellaea stictica* (Pentatomidae) and *Rhinacloa pallidipes* (Miridae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **1984**, 86, 519-520.
24. McBrien, H. L.; Millar, J. G.; Gottlieb, L.; Chen, X.; Rice, R. E., Male-produced sex attractant pheromone of the green stink bug, *Acrosternum hilare* (Say). *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 1821-1839.
25. Blum, M. S.; Traynham, C., & Boggus, n-Tridecane and trans-2-heptenal in scent gland of the rice stink bug *Oebalus pugnax*. *Science* **132:1480-1481. 1960.**
26. Aldrich, J. R.; Blum, M. S.; Lloyd, H. A.; Fales, H. M., Pentatomid natural products: chemistry and morphology of the III-IV dorsal abdominal glands of adults. *J. Chem. Ecol.* **1978**, 4, 161-172.

27. Moraes, M. C. B.; Pareja, M.; Laumann, R. A.; Borges, M., The chemical volatiles (Semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotrop. Entomol.* **2008**, 37, 489-505.
28. Marques, F. A.; Wendler, E. P.; Sales Maia, B. H. L. N.; Ventura, M. U.; Arruda-Gatti, I. C., Identification of defensive compounds in metathoracic glands of adults of the stink bug *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, 18, 1242-1246.
29. Borges, M.; Aldrich, J. R., Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Experientia* **1992**, 48, 893-896.
30. Borges, M.; Mori, K.; Costa, M. L. M.; Sujii, E. R., Behavioural evidence of methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate as a sex pheromone of *Euschistus heros* (Het., Pentatomidae). *J. Appl. Entomol.* **1998**, 122, 335-338.
31. Borges, M.; Zarbin, P. H. G.; Ferreira, J. T. B.; Da Costa, M. L. M., Pheromone sharing: Blends based on the same compounds for *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii*. *J. Chem. Ecol.* **1999**, 25, 629-634.
32. Tillman, P. G.; Aldrich, J. R.; Khimian, A.; Cottrell, T. E., Pheromone attraction and cross-attraction of *Nezara*, *Acrosternum*, and *Euschistus* spp. stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) in the field. *Environ. Entomol.* **2010**, 39, 610-617.
33. Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Lusby, W. R.; Kochhar, T. S.; Lockwood, J. A., Pheromone strains of the cosmopolitan pest, *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Exp. Zool.* **1987**, 244, 171-175.
34. Aldrich, J. R.; Lusby, W. R.; Marron, B. E.; Nicolaou, K. C.; Hoffmann, M. P.; Wilson, L. T., Pheromone blends of green stink bugs and possible parasitoid selection. *Naturwissenschaften* **1989**, 76, 173-175.

35. Borges, M.; Jepson, P. C.; Howse, P. E., Long-range mate location and close-range courtship behaviour of the green stink bug, *Nezara viridula* and its mediation by sex pheromones. *Entomol. Exp. Appl.* **1987**, 44, 205-212.
36. Borges, M.; Millar, J. G.; Laumann, R. A.; Moraes, M. C. B., A male-produced sex pheromone from the neotropical redbanded stink bug, *Piezodorus guildinii* (W.). *J. Chem. Ecol.* **2007**, 33, 1235-1248.
37. Borges, M.; Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Birkett, M.; Chiba, M.; Murata, Y.; Chuman, T.; Laumann, R. A.; Barrigossi, J. A.; Pickett, J. A.; Moraes, M. C. B., Sex attractant pheromone from the rice stalk stink bug, *Tibraca limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Chem. Ecol.* **2006**, 32, 2749-2761.
38. Cassier, P.; Nagnan, P.; Losa, J. F.; Andre, M.; Guillaumin, D., Fine structure and physicochemical analysis of the nymphal and imaginal scent gland systems of *Lincus spurcus* (Rolston) (Heteroptera: Pentatomidae). *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* **1994**, 23, 371-382.
39. Pavis, C.; Malosse, C.; Ducrot, P. H.; Descoins, C., Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): chemistry of secretions of five instars and role of (E)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20, 2213-2227.
40. Ho, H.-Y.; Millar, J. G., Compounds in metathoracic glands of adults and dorsal abdominal glands of nymphs of the stink bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zool. Stud.* **2001**, 40, 193-198.
41. Pareja, M.; Borges, M.; Laumann, R. A.; Moraes, M. C. B., Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Insect Physiol.* **2007**, 53, 639-648.

42. Aldrich, J. R.; Blum, M. S.; Hefetz, A.; Fales, H. M.; Lloyd, H. A.; Roller, P., Proteins in a nonvenomous defensive secretion: biosynthetic significance. *Science* **1978**, 201, 452-454.
43. Lockwood, J. A.; Story, Bifunctional pheromone in the first instar of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae): Its characterization and interaction with other stimuli. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78:474-479. **1985**.
44. Fucarino, A.; Millar, J. G.; McElfresh, J. S.; Colazza, S., Chemical and physical signals mediating conspecific and heterospecific aggregation behavior of first instar stink bugs. *J. Chem. Ecol.* **2004**, 30, 1257-1269.
45. Aldrich, J. R., Testing the "new associations" biological control concept with a tachinid parasitoid (*Euclytia flava*). *J. Chem. Ecol.* **1995**, 21, 1031-1042.
46. Fávaro, C. F.; Rodrigues, M. A. C. d. M.; Aldrich, J. R.; Zarbin, P. H. G., Identification of semiochemicals in adults and nymphs of the stink bug *Pallantia macunaima* Grazia (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 58-64.
47. Attygalle, A. B., Microchemical Techniques. In *Methods in Chemical Ecology*, Millar, J. G.; Haynes, K. F., Eds. Chapman & Hall: New York, 1998; Vol. 1, pp 207-294.
48. Ayres, M.; Ayres, M. J.; Ayres, D. L.; Santos, A. S., *BioEstat3.0, Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, 2003.
49. Feldlaufer, M. F.; Domingue, M. J.; Chauhan, K. R.; Aldrich, J. R., 4-oxo-Aldehydes from the dorsal abdominal glands of the bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* **2010**, 47, 140-143.
50. Moreira, J. A.; Millar, J. G., Short and simple syntheses of 4-oxo-(E)-2-hexenal and homologs: Pheromone components and defensive compounds of hemiptera. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 965-968.

51. Ferreira, J. T. B.; Zarbin, P. H. G., Pheromone syntheses: A tropical approach. Enantioselective synthesis of the (2R,6S,10S) and (2S,6S,10S) isomers of methyl 2,6,10-trimethyldodecanoate. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 381-388.
52. Adams, R. P., *Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry*. 4 ed.; Allured Publ. Corporation: 2007.
53. Zarbin, P. H. G.; Borges, M.; dos Santos, A. A.; de Oliveria, A. R. M.; Simonelli, F.; Marques, F. A., Alarm Pheromone System of Stink Bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, 11, 424-428.
54. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons: New York, 2005.
55. Smith, B. C., *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. CRC Press: New York, 1999.
56. Staddon, B. W.; Gough, A. J. E.; Olagbemiro, T. O.; Games, D. E., Sex dimorphism for ester production in the metathoracic scent gland of the lygaeid bug *Spilostethus rivularis* (German) (Heteroptera). *Comp. Biochem. Physiol.* **1985**, 80B, 235-239.
57. El-Sayed, A. M., The Pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. In 2011.
58. Gilby, G. R.; Waterhouse, Secretions from the lateral scent glands of the green vegetable bug, *Nezara viridula*. *Nature* **1967**, 216, 90-91.
59. Lockwood, J. A.; Story, Defensive secretion of the southern green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1987**, 80, 686-691.
60. Peres, W. A. A. Aspectos bioecológicos e táticas de manejo dos percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus), *Euschistus heros* (Fabricius) e *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) em cultivo orgânico de soja. Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2004.

61. Gunawardena, N. E.; Herath, H. M. W. K. B., Significance of medium chain n-alkanes as accompanying compounds in hemipteran defensive secretions: An investigation based on the defensive secretion of *Coridius janus*. *J. Chem. Ecol.* **1991**, 17, 2449-2458.
62. Carayon, J., Notes et documents sur l'appareil odorant metathoracique des Hemipteres. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **1971**, 7, 737-770.
63. Aldrich, J. R.; Leal, W. S.; Nishida, R.; Khrimian, A. P.; Lee, C.-J.; Sakuratani, Y., Semiochemistry of aposematic seed bugs. *Entomol. Exp. Appl.* **1997**, 84, 127-135.
64. Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Taghizadeh, T.; Ferreira, J. T. B.; Liewehr, D., Pheromones and colonization: Reassessment of the milkweed bug migration model (Heteroptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Chemoecol.* **1999**, 9, 63-71.
65. Aldrich, J. R.; Zhang, A.; Oliver, J. E., Attractant pheromone and allomone from the metathoracic scent gland of a broad-headed bug (Hemiptera: Alydidae). *Can. Entomol.* **2000**, 132, 915-923.
66. Leal, W. S.; Higuchi, H.; Mizutani, N.; Nakamori, H.; Kadosawa, T.; Ono, M., Multifunctional communication in *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae): Conspecific nymphs and egg parasitoid *Ooencyrtus nezarae* use the same adult attractant pheromone as chemical cue. *J. Chem. Ecol.* **1995**, 21, 973-985.
67. Leal, W. S.; Ueda, Y.; Ono, M., Attractant pheromone for male rice bug, *Leptocorisa chinensis*: Semiochemicals produced by both male and female. *J. Chem. Ecol.* **1996**, 22, 1429-1437.
68. Millar, J. G.; Rice, R. E.; Wang, Q., Sex pheromone of the mirid bug *Phytocoris relativus*. *J. Chem. Ecol.* **1997**, 23, 1743-1754.
69. Smith, R. F.; Pierce Jr., H. D.; Borden, J. H., Sex pheromone of the mullein bug, *Campylomma verbasci* (Meyer) (Heteroptera: Miridae). *J. Chem. Ecol.* **1991**, 17, 1437-1447.

70. Zhang, Q.-H.; Aldrich, J. R., Pheromones of milkweed bugs (Heteroptera : Lygaeidae) attract wayward plant bugs: *Phytocoris* mirid sex pheromone. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29, 1835-1851.
71. Zhang, Q.-H.; Aldrich, J. R., Sex pheromone of the plant bug, *Phytocoris calli* Knight. *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34, 719–724.
72. Soldi, R. A.; Rodrigues, M. A. C. d.; Aldrich, J. R.; Zarbin, P. H. G., The sex pheromone of the true bug *Phthia picta* (Heteroptera: Coreidae) is an unusual hydrocarbon. . *J. Chem. Ecol.* **2012**, in press.
73. Leal, W. S.; Kuwahara, S.; Shi, X.; Higuchi, H.; Marino, C. E. B.; Ono, M.; Meinwald, J., Male-released sex pheromone of the stink bug *Piezodorus hybneri*. *J. Chem Ecol.* **1998**, 24, 1817-1829.
74. Aldrich, J. R.; Hoffmann, M. P.; Kochansky, J. P.; Lusby, W. R.; Eger, J. E.; Payne, J. A., Identification and attractiveness of a major pheromone component for Nearctic *Euschistus* spp. stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* **1991**, 20, 477-483.
75. Krupke, C. H.; Brunner, J. F.; Doerr, D. D.; Kahn, A. D., Field Attraction of the Stink Bug *Euschistus conspersus* (Hemiptera: Pentatomidae) to Synthetic Pheromone-Baited Host Plants. *J. Econ. Entomol.* **2001**, 94, 1500-1505.
76. Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Lusby, W. R.; Kochansky, J. P.; Borges, M., Identification of male-specific volatiles from Nearctic and Neotropical stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20, 1103-1111.
77. Ho, H. Y.; Millar, J. G., Identification and synthesis of male-produced sex pheromone components of the stink bugs *Chlorochroa ligata* and *Chlorochroa uhleri*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 2067-2095.

78. Ho, H.-Y.; Millar, J. G., Identification and Synthesis of a Male-Produced Sex Pheromone from the Stink Bug *Chlorochroa sayi*. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, 1177-1201.
79. Francke, W., Structure elucidation of some naturally occurring carbonyl compounds upon coupled gas chromatography/mass spectrometry and micro-reactions. *Chemoecology* **2010**, 20, 163-169.
80. Silva, L. B.; Alles, I. M.; Morel, A. F.; Ionara, I. D., Produtos naturais no ensino de química: Experimentação para o isolamento dos pigmentos do extrato de Páprica. *Química Nova na Escola* **2006**, 23, 52-53.
81. Vogel, A. I., *Química Organica*. Ao Livro Técnico: 1971.
82. Rodstein, J.; McElfresh, J.; Barbour, J.; Ray, A.; Hanks, L.; Millar, J., Identification and synthesis of a female-produced sex pheromone for the cerambycid beetle *Prionus californicus*. *J. Chem. Ecol.* **2009**, 35, 590-600.
83. Commeiras, L.; Parrain, J.-L., Concise enantioselective synthesis of furocaulerpin. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 509-517.
84. Li, J. J.; Limberakis, C.; Pflum, D. A., *Modern Organic Synthesis in the Laboratory: A Collection of Standard Experimental Procedures*. Oxford University Press: 2007.
85. Hu, T.-S.; Yu, Q.; Wu, Y.-L.; Wu, Y., Enantioselective Syntheses of Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins Tonkinecin and Annonacin Starting from Carbohydrates. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 853-861.
86. Cahiez, G.; Gager, O.; Buendia, J., ChemInform Abstract: New Insights into the Copper-Catalyzed Alkylation of Grignard and Organolithium Reagents. *ChemInform* **2010**, 41, no-no.
87. Mori, K.; Itou, M.; Brossut, R., Pheromone synthesis, CXXI. Synthesis of (4R*,5R*,6S*,7E,9E)-4,6,8-trimethyl-7,9-undecadien-5-ol and its isomers to determine the

relative stereochemistry of the female specific compound of the woodroach *Cryptocercus punctulatus*. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1990**, 1990, 1249-1255.

88. Armstrong-Chong, R. J.; Matthews, K.; Chong, J. M., Sequential alkynylation of ω -bromoalkyl triflates: facile access to unsymmetrical non-conjugated diynes including precursors to diene pheromones. *Tetrahedron* **2004**, 60, 10239-10244.

89. Zarbin, P. H. G.; Reckziegel, A.; Plass, E.; Borges, M.; Francke, W., Synthesis and biological activity of methyl 2,6,10-trimethyldodecanoate and methyl 2,6,10-trimethyltridecanoate: Male produced sexual pheromones of stink bugs *Euschistus heros* and *Piezodorus guildinii*. *J. Chem. Ecol.* **2000**, 26, 2737-2746.

90. Zarbin, P. H. G.; Princival, J. L.; de Lima, E. R.; dos Santos, A. A.; Ambrogio, B. G.; de Oliveira, A. R. M., Unsymmetrical double Wittig olefination on the syntheses of insect pheromones. Part 1: Synthesis of 5,9-dimethylpentadecane, the sexual pheromone of *Leucoptera coffeella*. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 239-241.

91. Vidal, D. M.; Fonseca, M. G.; Zarbin, P. H. G., Enantioselective synthesis and absolute configuration of the sex pheromone of *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 6704-6706.

92. Borges, M.; Aldrich, J. R., Attractant pheromone for Nearctic stink bug, *Euschistus obscurus* (Heteroptera: Pentatomidae): insight into a Neotropical relative. *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20, 1095-1102.

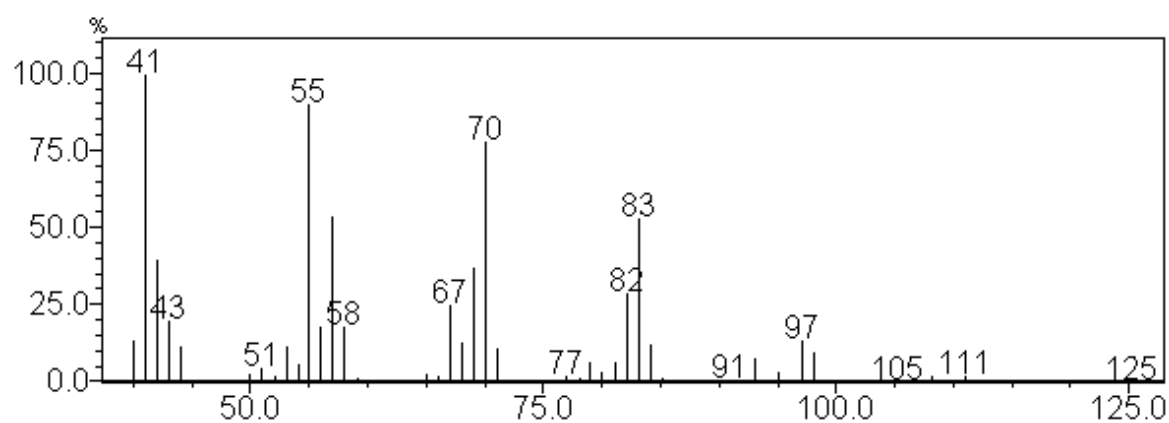
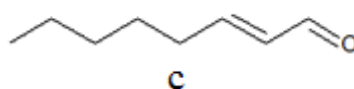
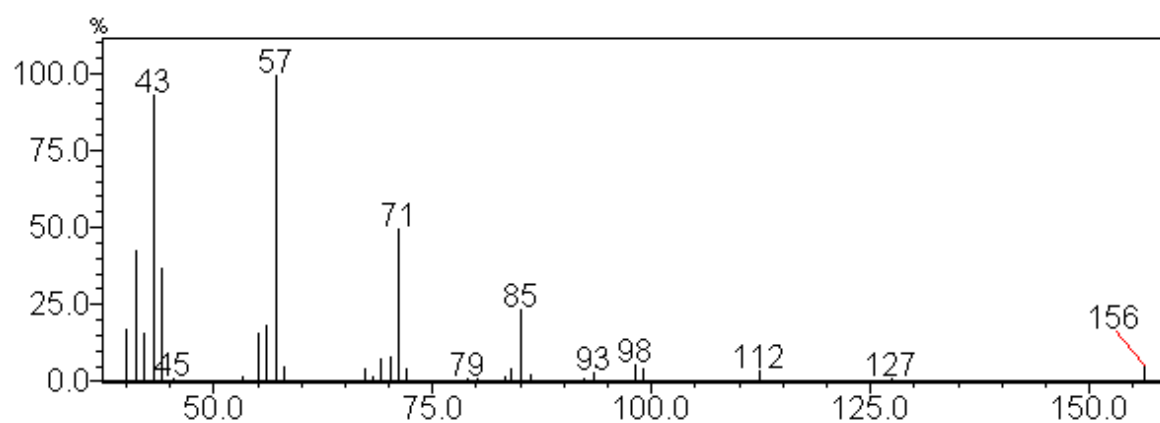
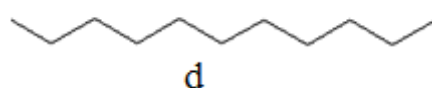
93. Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Lusby, W. R.; Kochansky, J. P., Identification of male-specific exocrine secretion from predatory stink bugs (Hemiptera, Pentatomidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **1986**, 3, 1-12.

94. Maruyama, K.; Katagiri, T., Mechanism of the Grignard reaction. *Journal of Physical Organic Chemistry* **1989**, 2, 205-213.

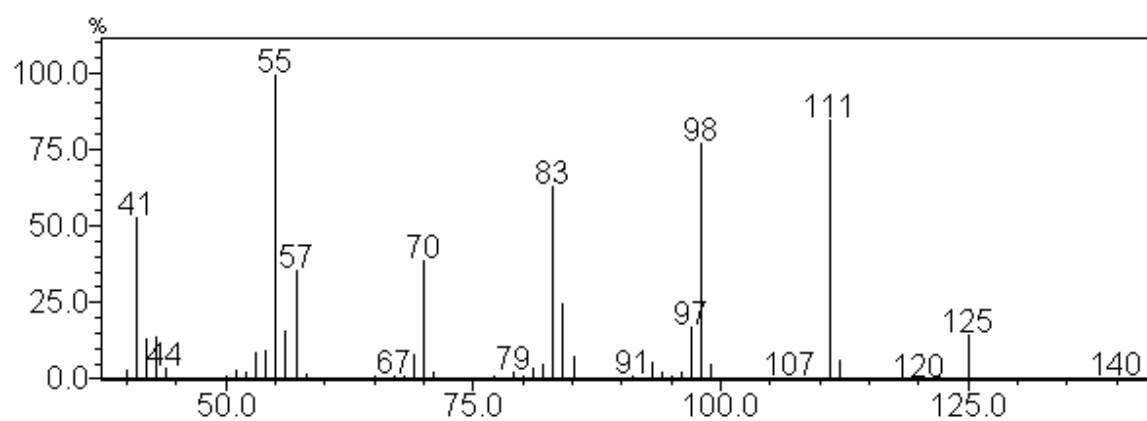
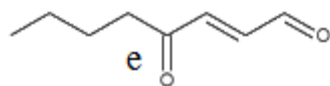
95. Mori, K.; Murata, N., Synthesis of methyl 2,6,10-trimethyltridecanoate, the male-produced pheromone of the stink bugs, *Euschistus heros* and *E. obscurus*, as a stereoisomeric mixture. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1994, 637-639.
96. Mori, K.; Murata, N., Synthesis of All of the Eight Stereoisomers of Methyl 2,6,10-Trimethyltridecanoate, the Male-produced Pheromone of the Stink Bugs, *Euschistus heros* and *E. obscurus*. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1994, 1153-1160.
97. Ho, H.-Y.; Hsu, Y.-C.; Chuang, Y.-C.; Chow, Y.-S., Effect of rearing conditions on production of sternal gland secretion, and identification of minor components in the sternal gland secretion of the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata*. *J. Chem. Ecol.* **2005**, 31, 29-37.
98. Zahn, D. K.; Moreira, J. A.; Millar, J. G., Identification, synthesis, and bioassay of a male-specific aggregation pheromone from the harlequin bug, *Murgantia histrionica*. *J. Chem. Ecol.* **2008**, 34, 238-251.
99. Fish, J.; Alcock, J., The behavior of *Chlorochroa ligata* (Say) and *Cosmopepla bimaculata* (Thomas), (Hemiptera: Pentatomidae). *Entomol. News* **1973**, 84, 262-268.
100. Harris, V. E.; Todd, J. W., Temporal and numerical patterns of reproductive behavior in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Entomol. Exp. Appl.* **1980**, 27, 105-116.
101. Wang, Q.; Millar, J. G., Reproductive behavior of *Thyanta pallidovirens* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1997**, 90, 380-388.
102. Aldrich, J. R., Chemical communication in the true bugs and parasitoid exploitation. In *Chemical Ecology of Insects.*, Cardé, R. T.; Bell, W. J., Eds. Chapman & Hall: New York, 1995; Vol. II, pp 318-363.

103. Harris, V. E.; Todd, J. W., Male-mediated aggregation of male, female and 5th instar southern green stink bugs and concomitant attraction of a tachinid parasitoid, *Trichopoda pennipes*. *Entomol. Exp. Appl.* **1980**, 27, 117-126.
104. Çokl, A., Stink bug interaction with host plants during communication. *J. Insect. Physiol.* **2008**, 54, 1113-1124.
105. Mori, K., Significance of chirality in pheromone science. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7505-7523.
106. Costa, M. L. M.; Borges, M.; Vilela, E. F.; Marco, P. M., Jr.; Lima, E. R., Effect of stereoisomers of the main component of the sex pheromone of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) in the attractiveness of females. *An. Soc. Entomol. Brasil* **2000**, 29, 413-422.

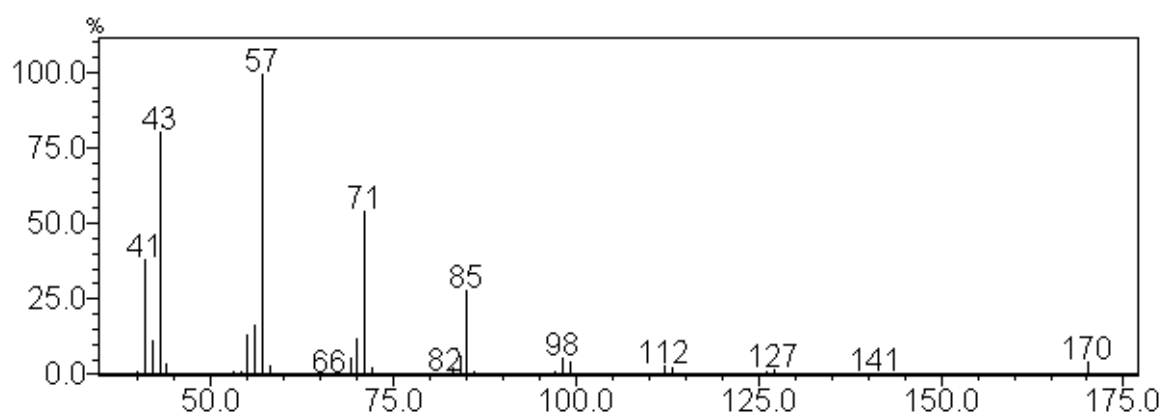
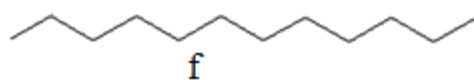
ESPECTROS SELECCIONADOS PARA O CAPÍTULO I

Espectro de massas do (E)-2-octenal (c)**Espectro de massas do undecano (d)**

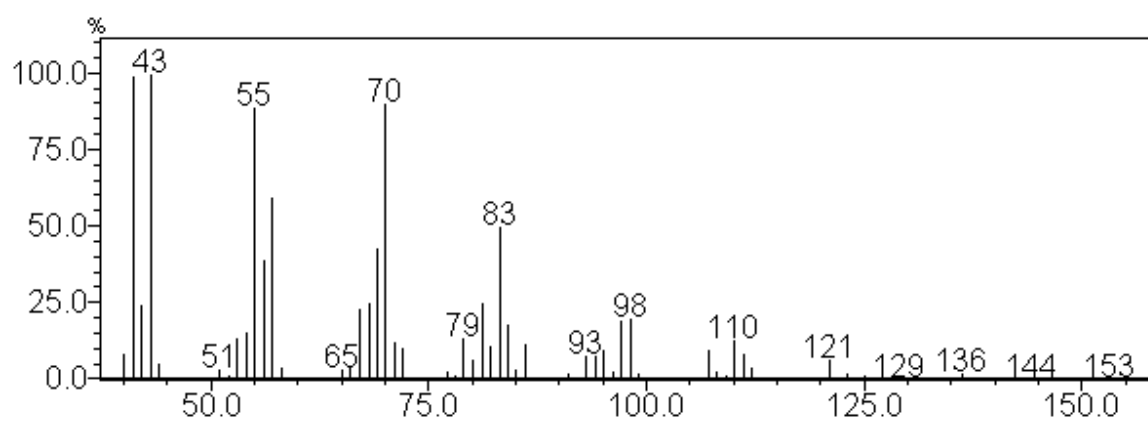
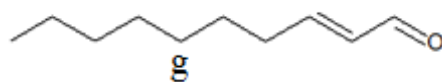
Espectro de massas do (*E*)-4-oxo-2-octenal (e)



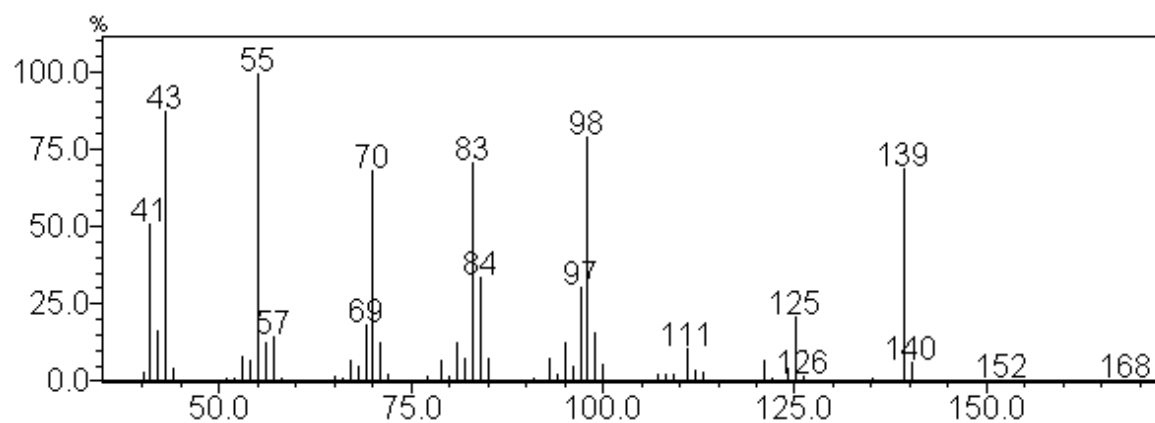
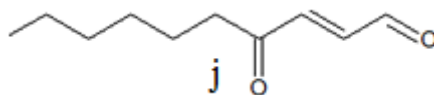
Espectro de massas do dodecano (f)



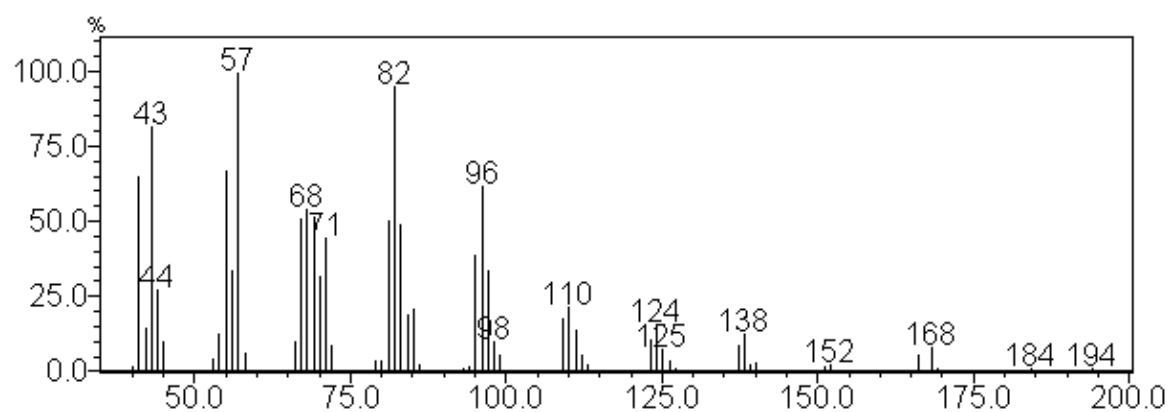
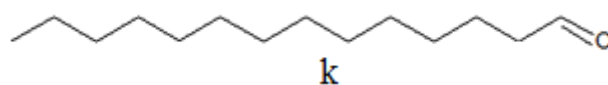
Espectro de massas do (E)-2-decenal (g)



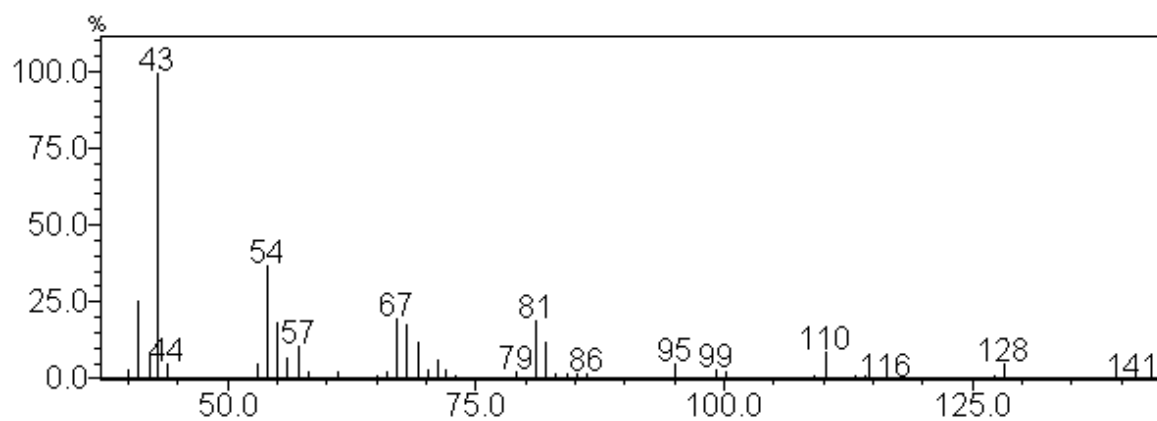
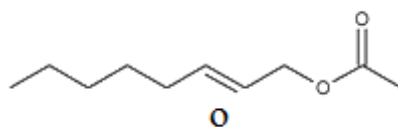
Espectro de massas do (E)-4-oxo-2-decenal (j)



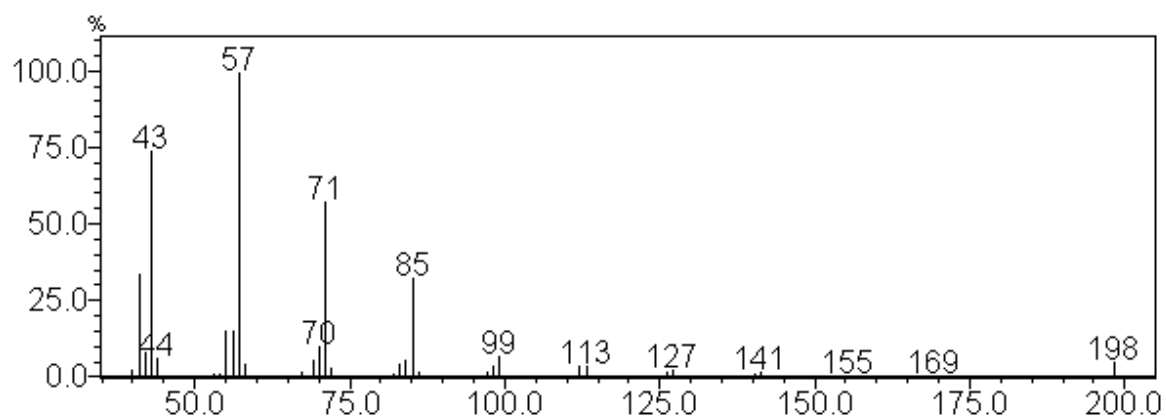
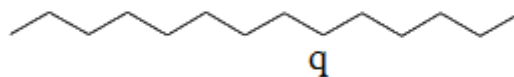
Espectro de massas do tetradecanal (k)



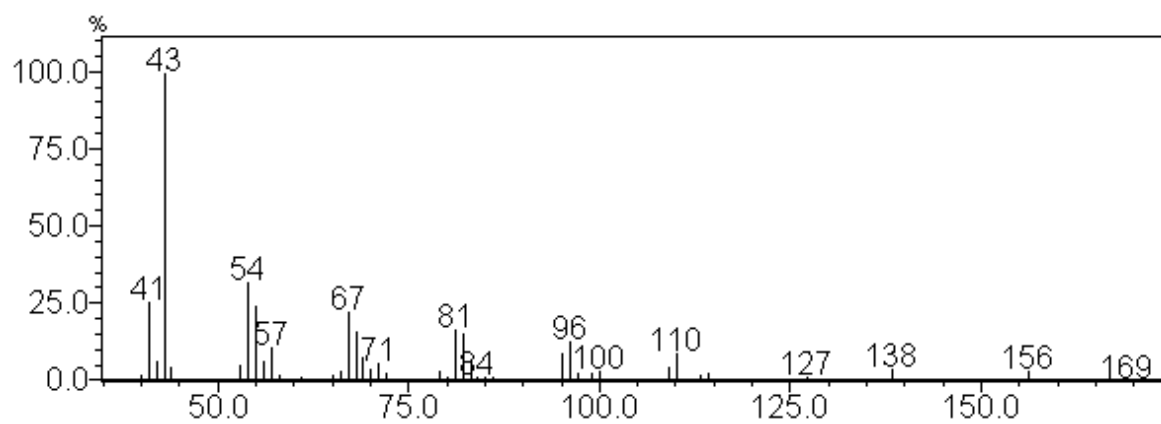
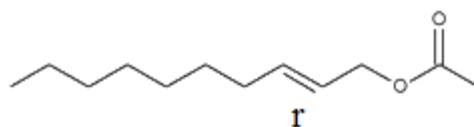
Espectro de massas do acetato de (*E*)-2-octenila (o)

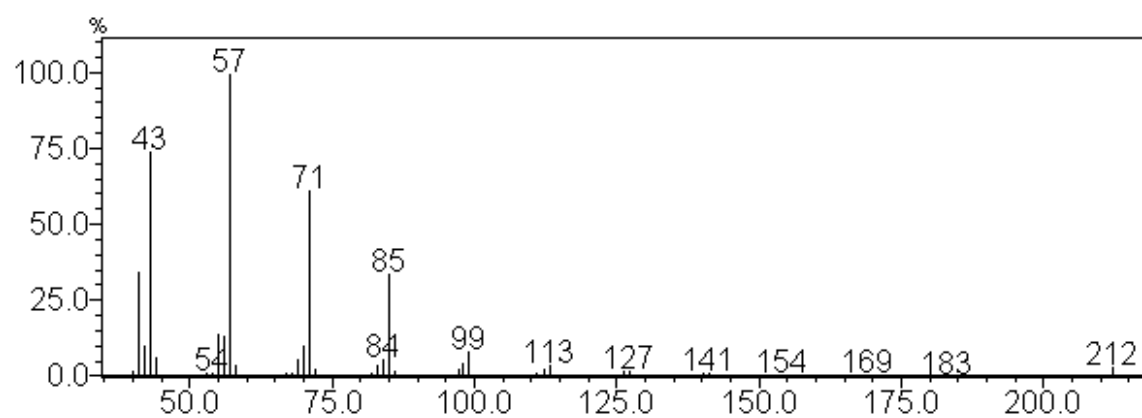
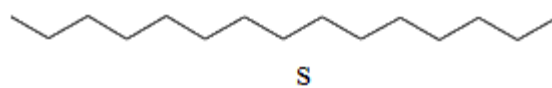


Espectro de massas do tetradecano (q)

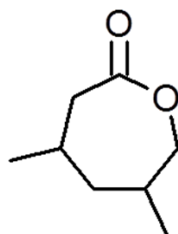
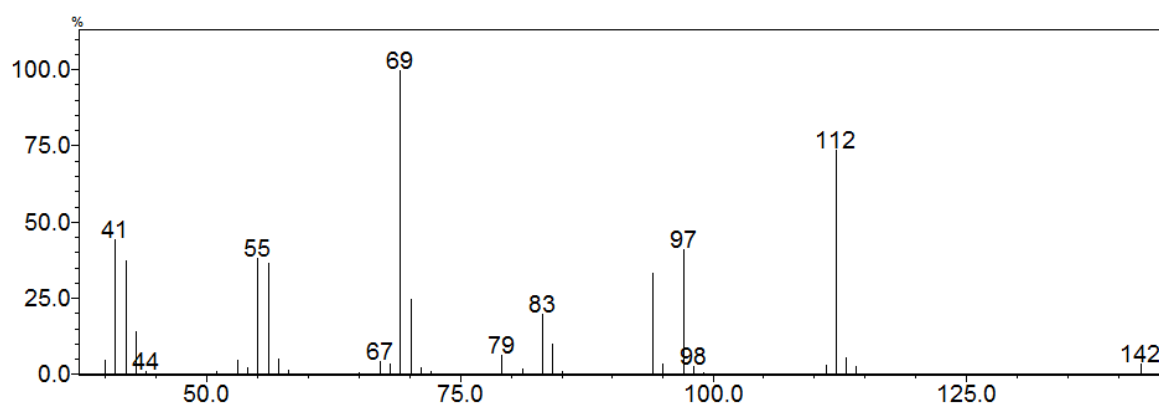


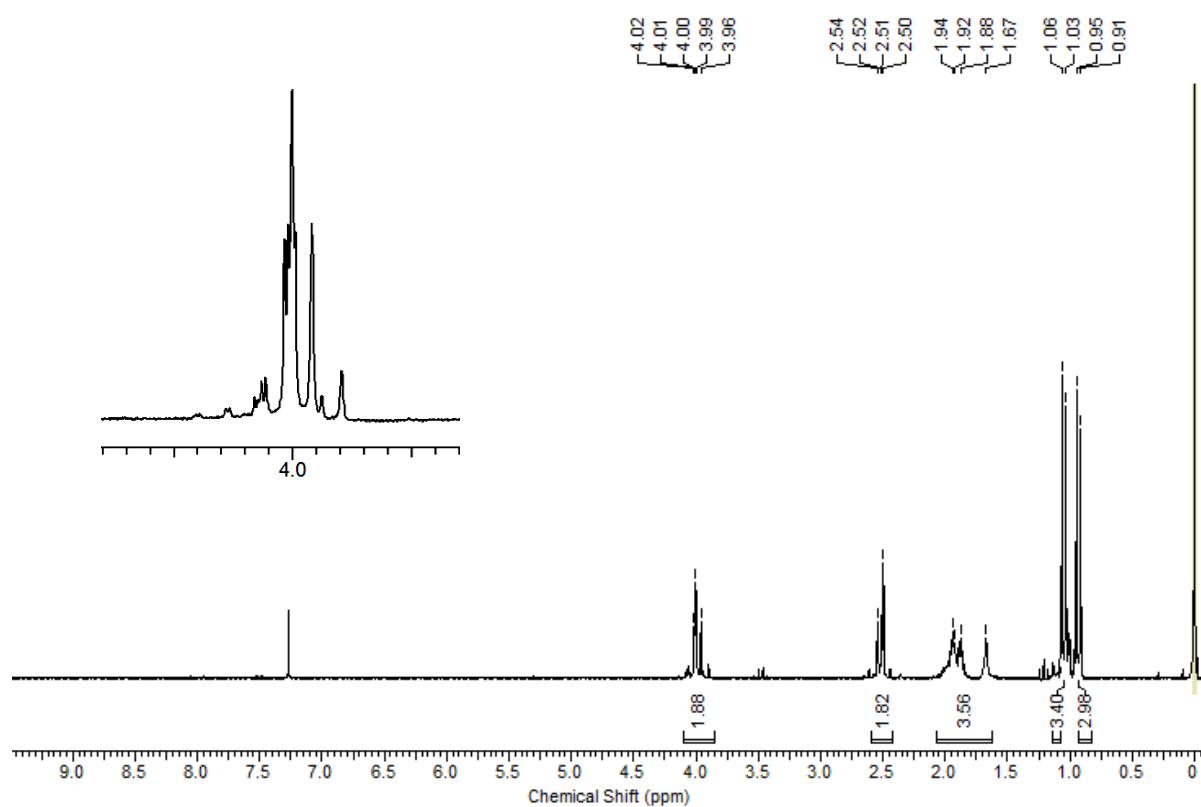
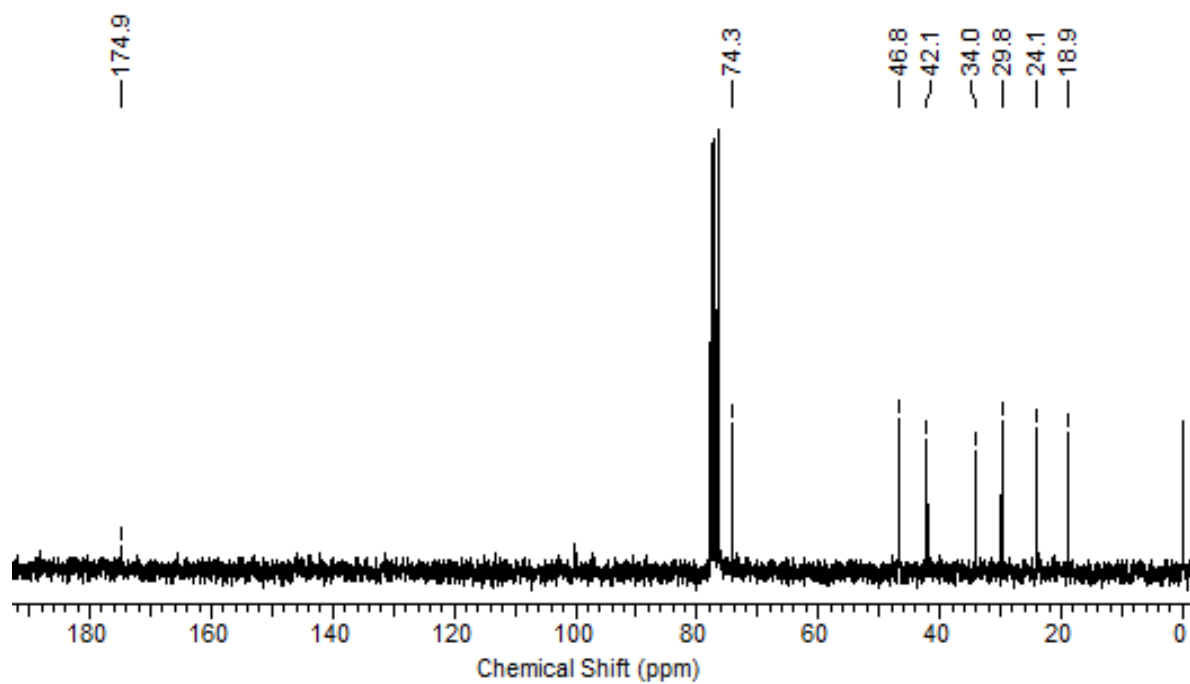
Espectro de massas do acetato de (*E*)-2-decenila (r)

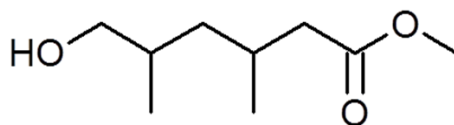
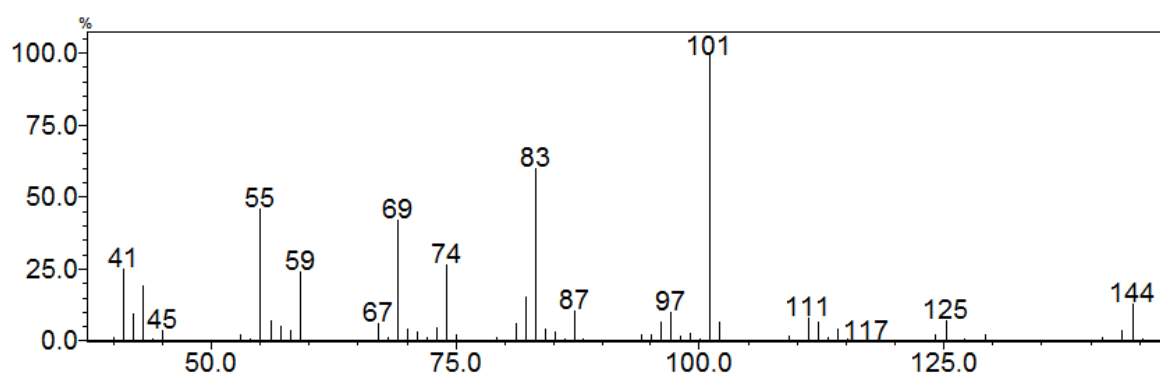


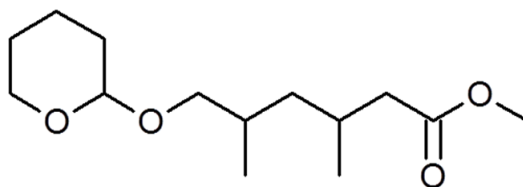
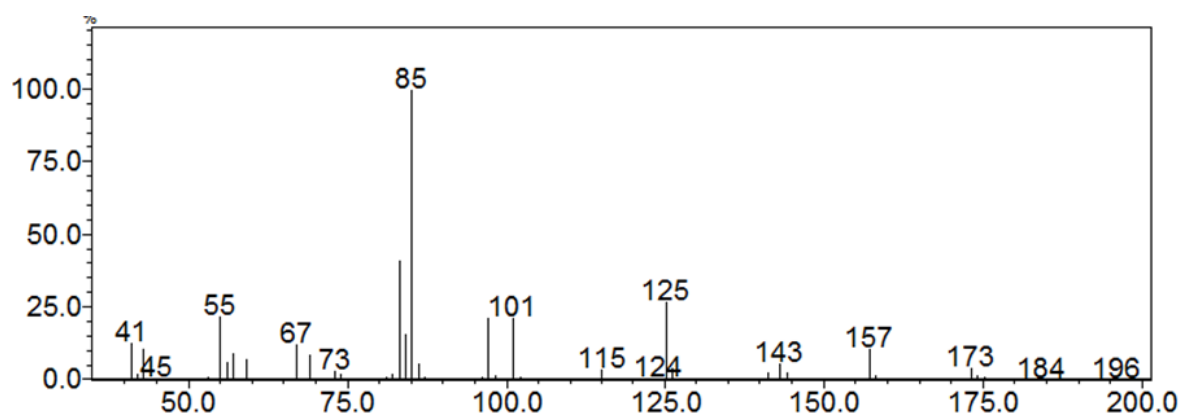
Espectro de massas do pentadecano (s)

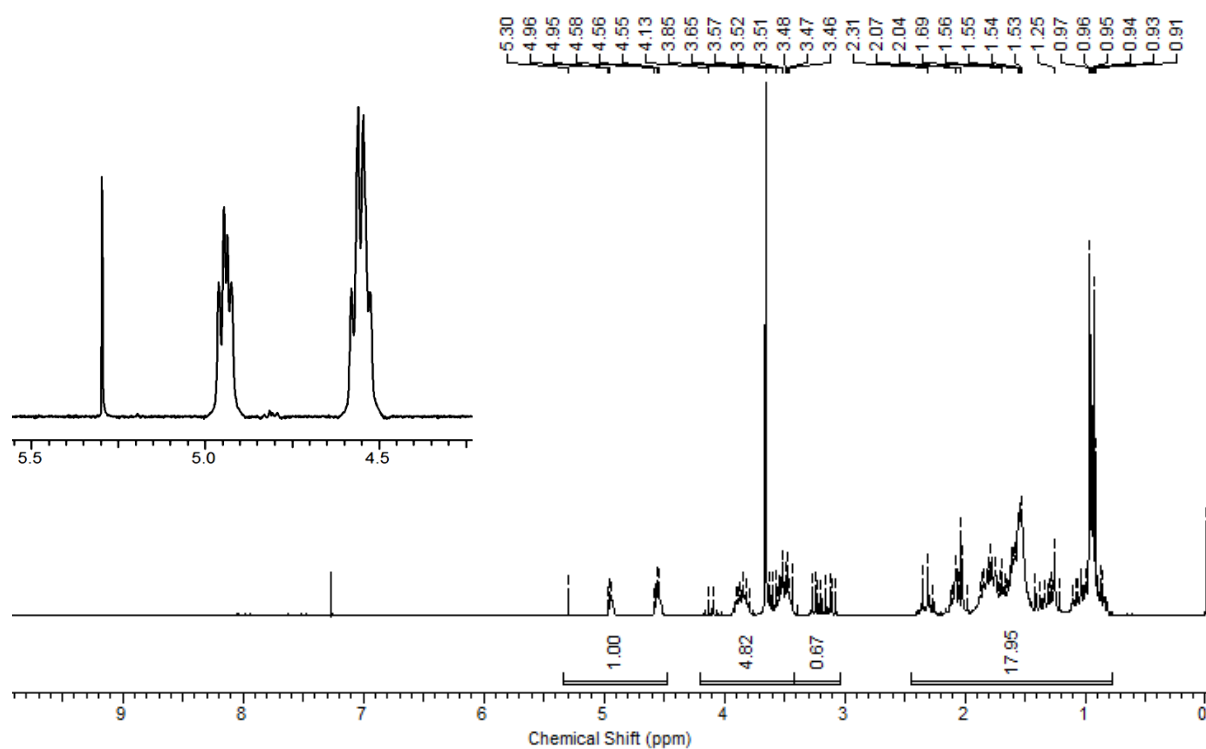
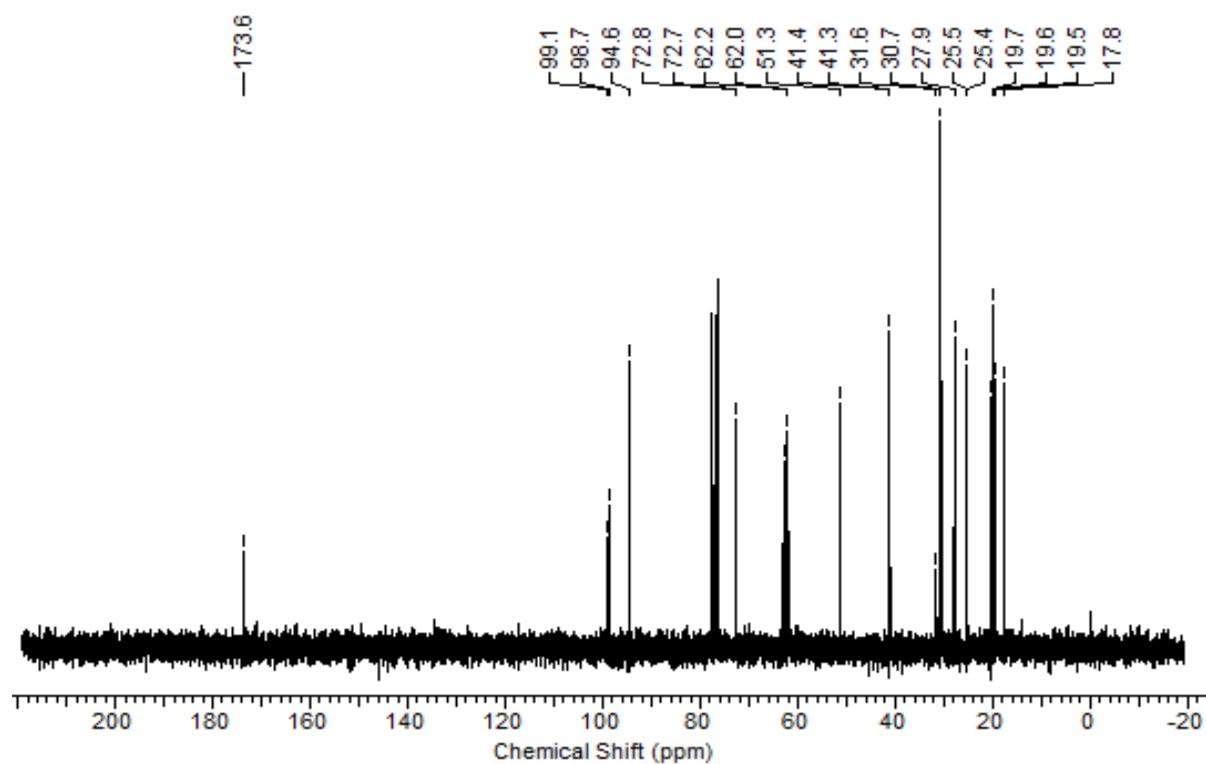
ESPECTROS SELECCIONADOS PARA O CAPÍTULO II

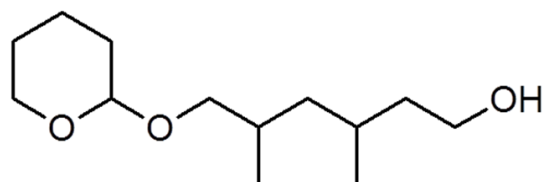
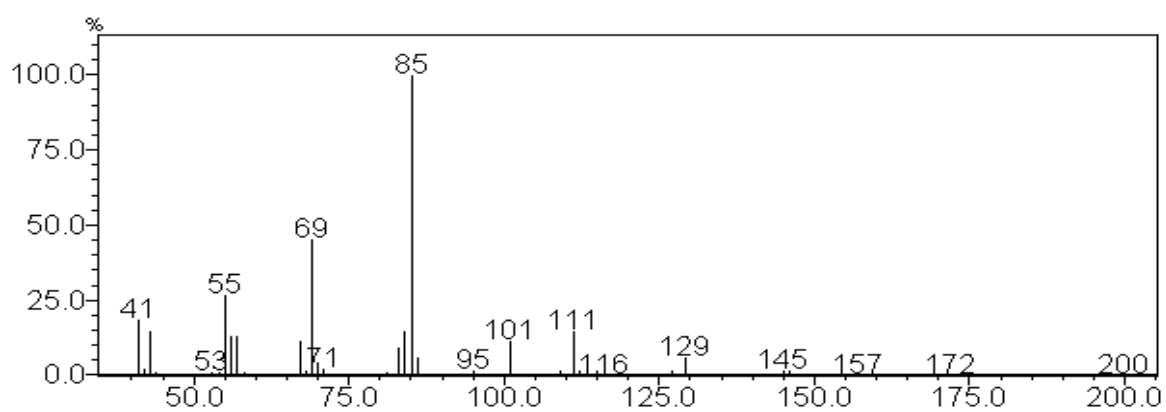
Síntese do 4,6-dimetil-2-oxepanona (2)**Espectro de massas do composto 2**

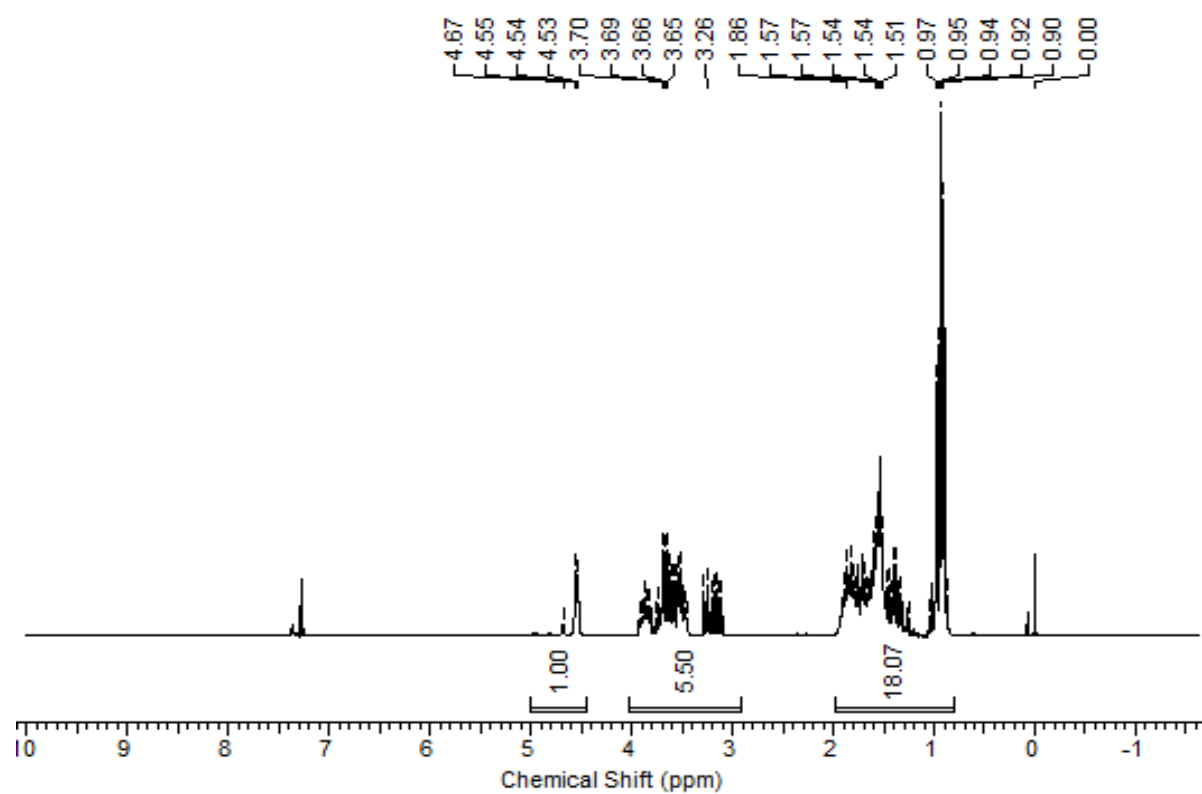
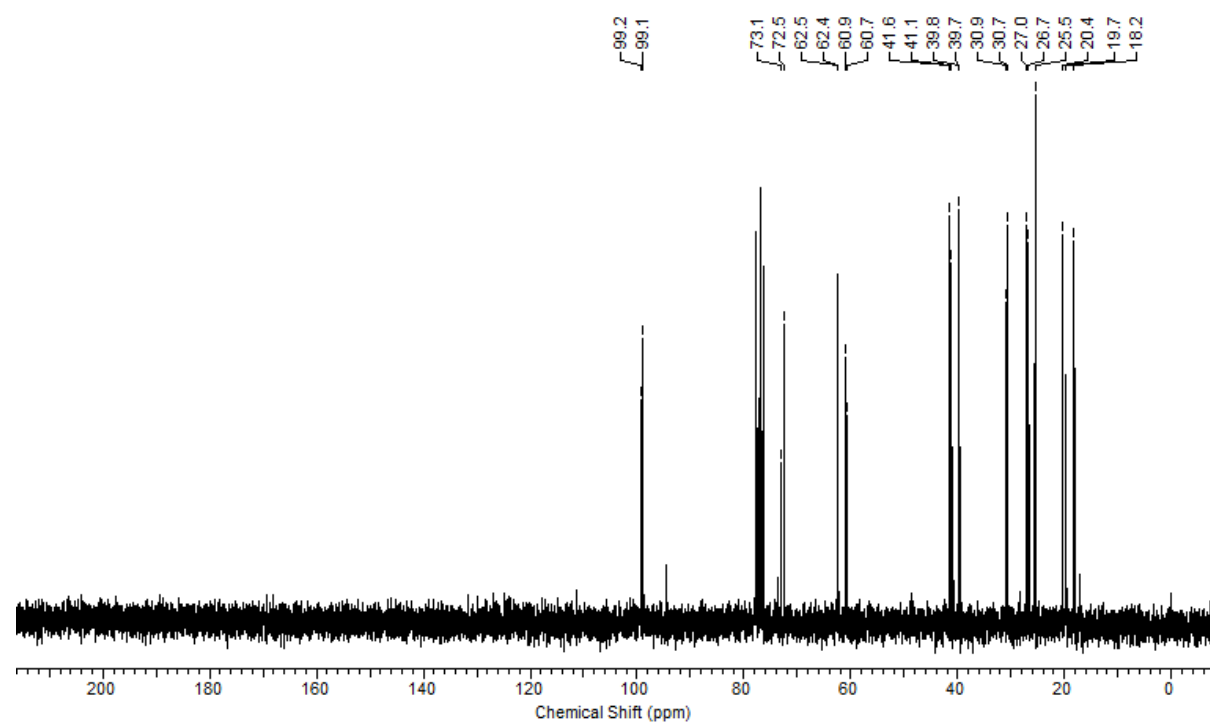
Espectro de RMN de ^1H do composto 2**Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2**

Síntese do 6-hidroxi-3,5-dimetilhexanoato de metila (3)**Espectro de massas do composto 3**

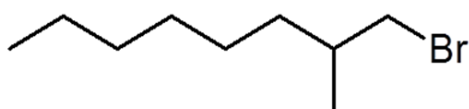
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexanoato de metila (4)**Espectro de massas do composto 4**

Espectro de RMN de ^1H do composto 4**Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4**

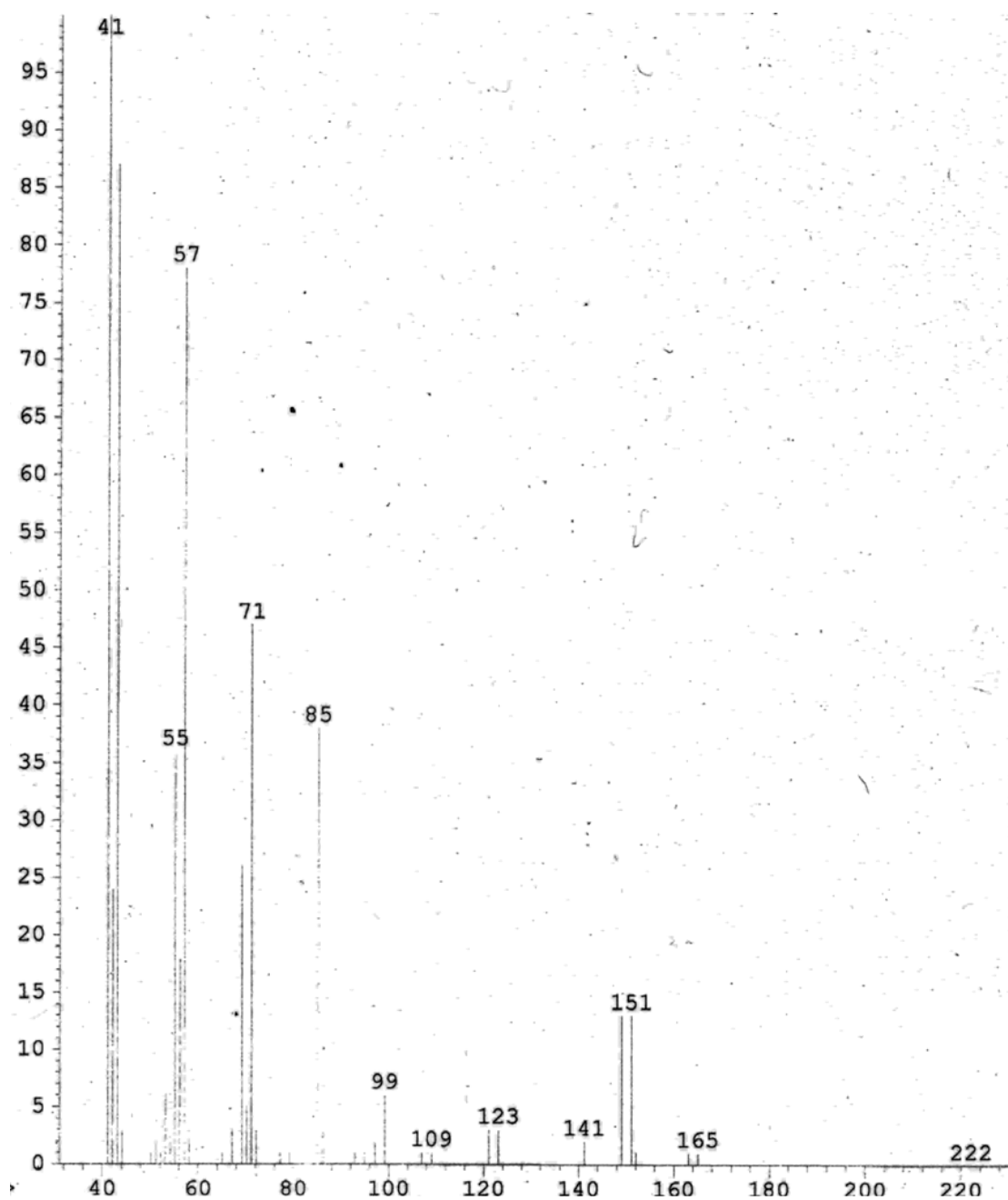
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexan-1-ol (5)**Espectro de massas do composto 5**

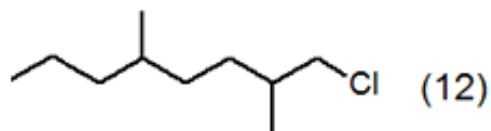
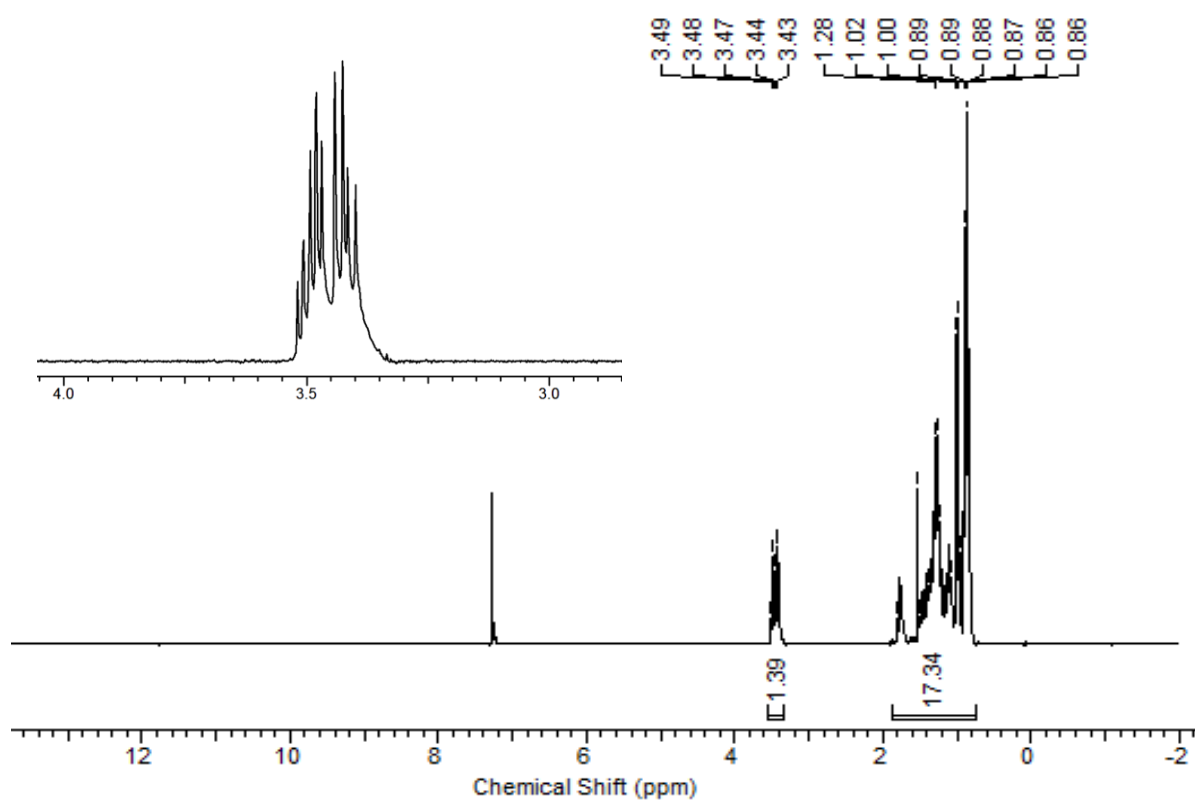
Espectro de RMN de ^1H do composto 5**Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5**

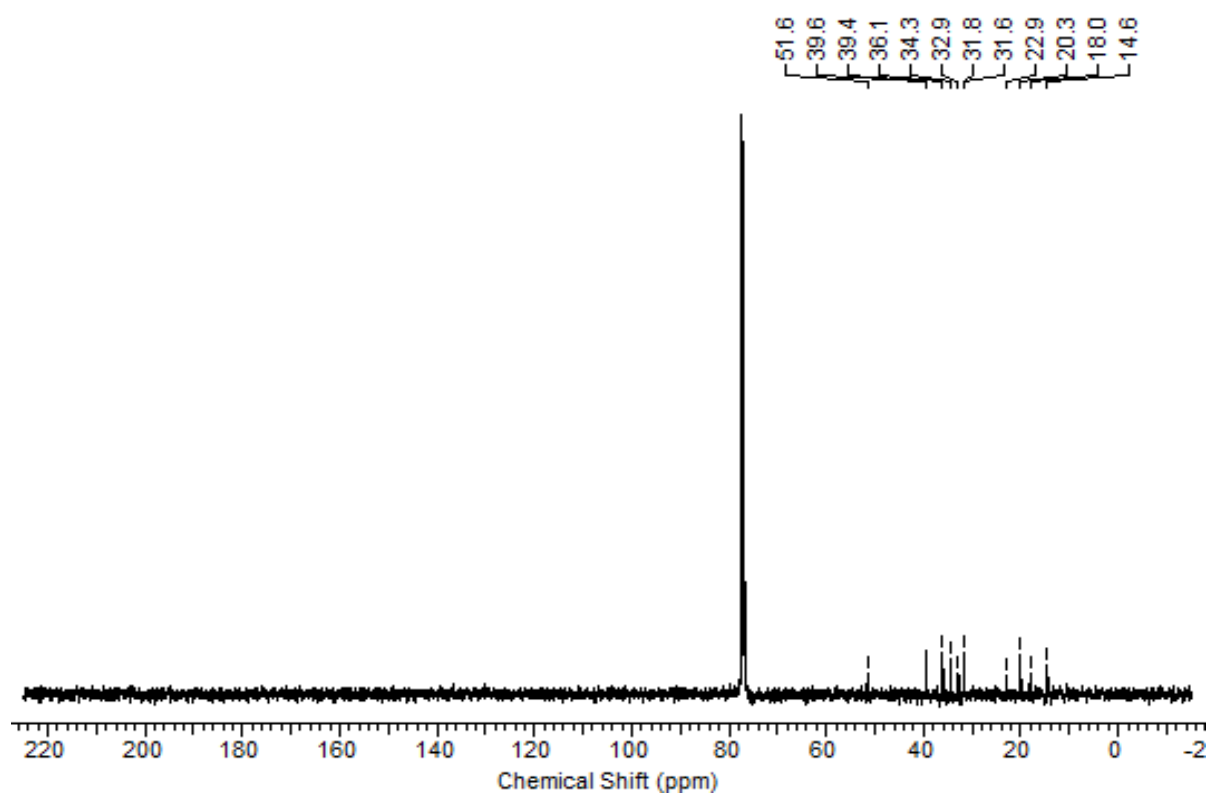
Síntese do 1-bromo-2-metilnonano (8)

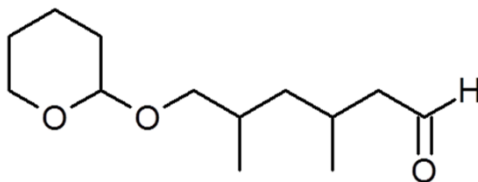
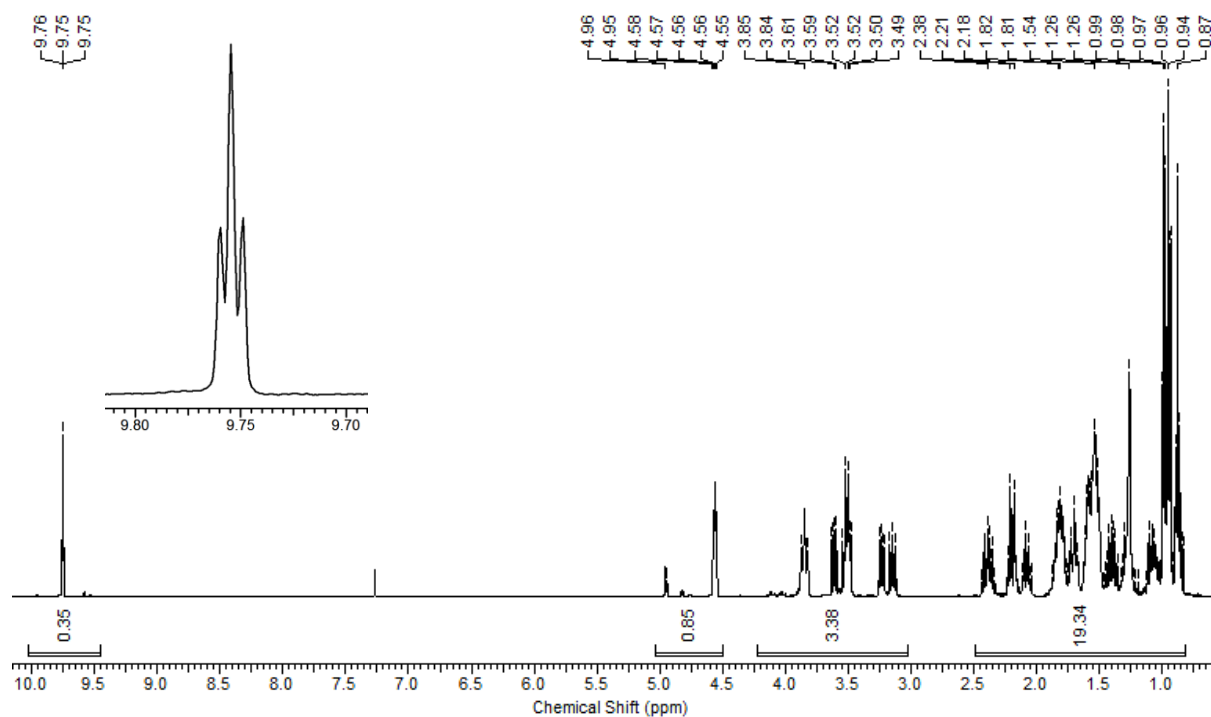


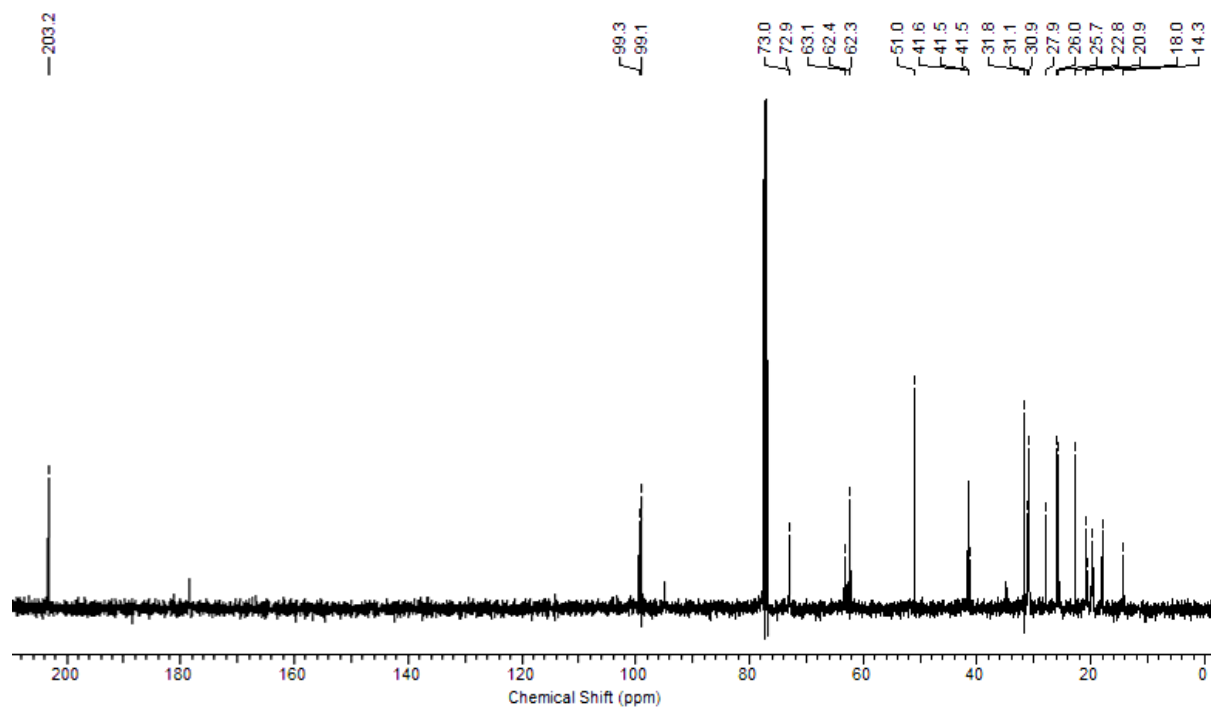
Espectro de massas do composto 8

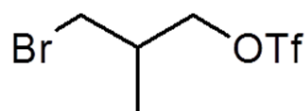
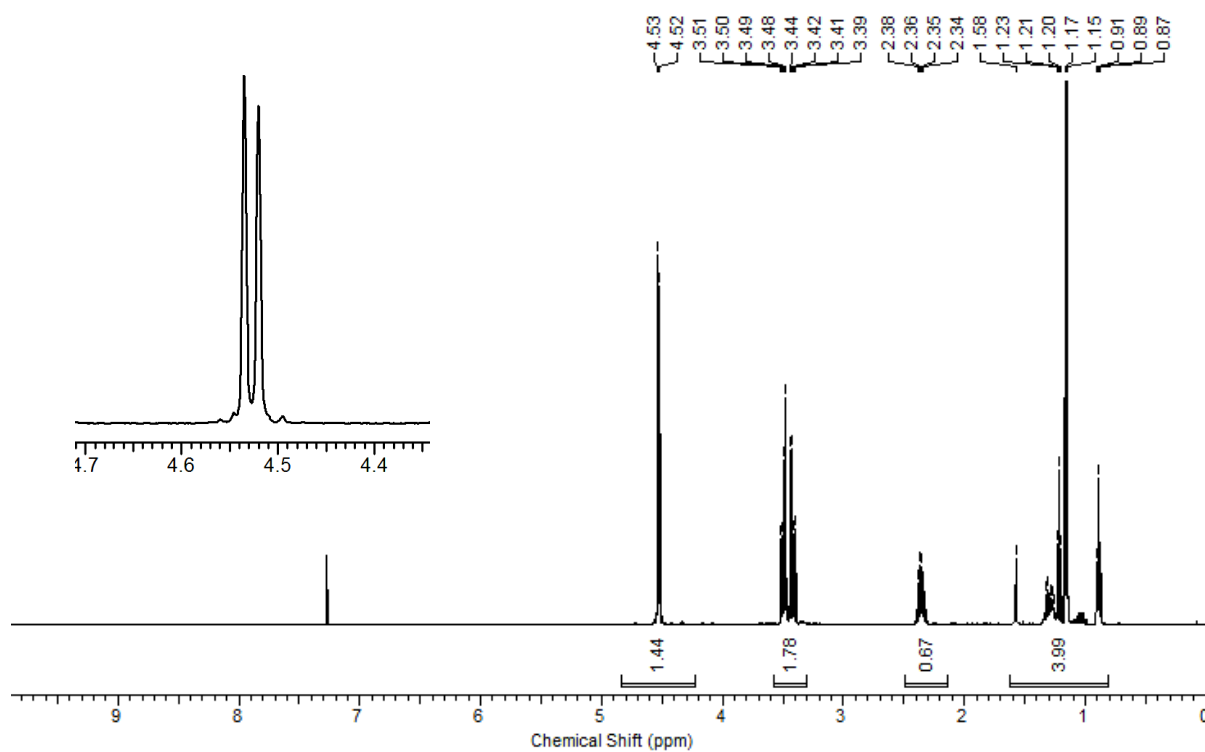


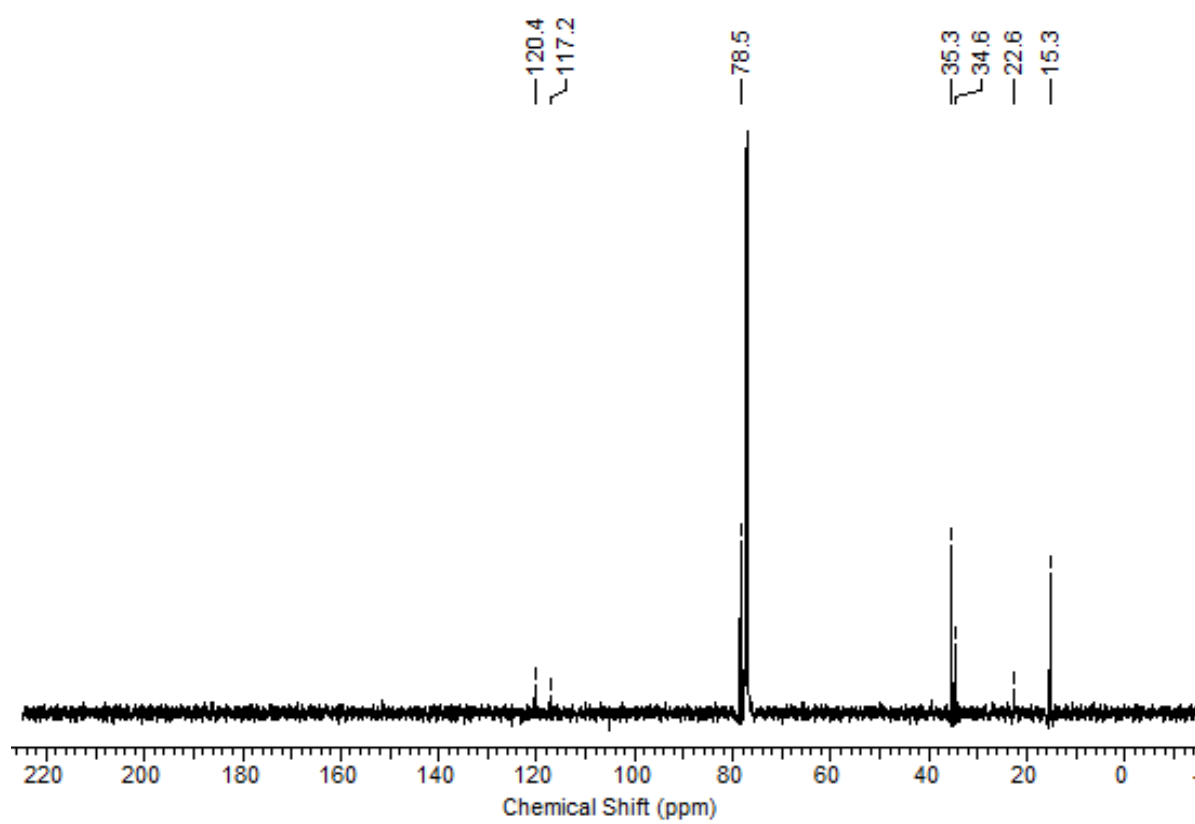
Síntese do 1-cloro-2,5-dimetiloctano (12)**Espectro de RMN de ^1H do composto 12**

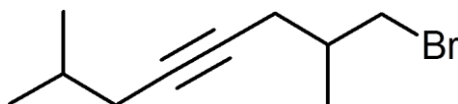
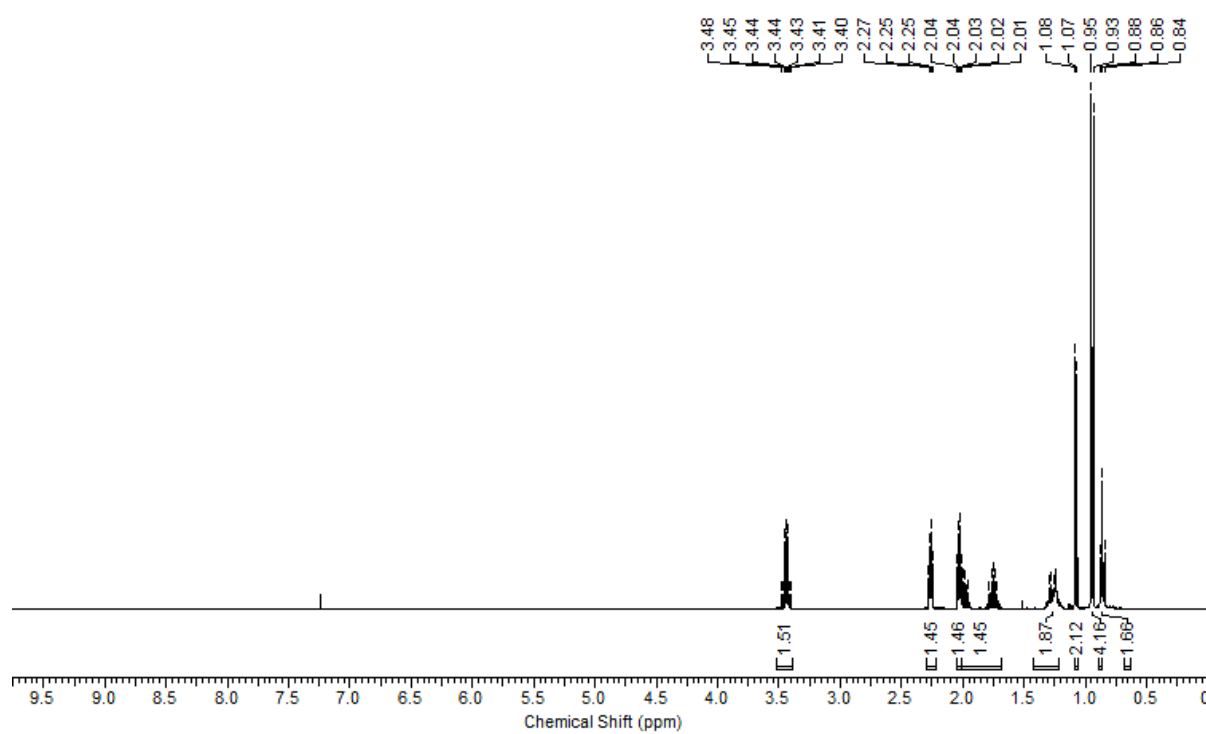
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12

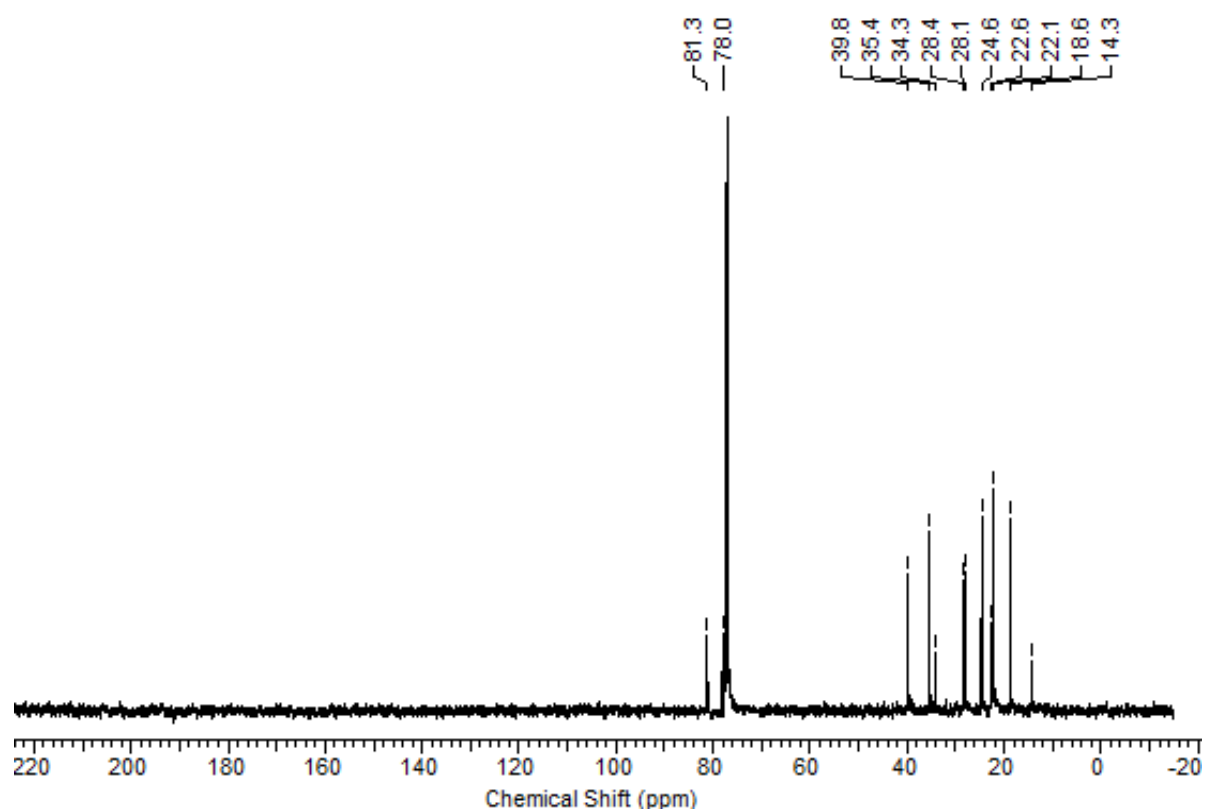
Síntese do 3,5-dimetil-6-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)hexanal (14)**Espectro de RMN de ^1H do composto 14**

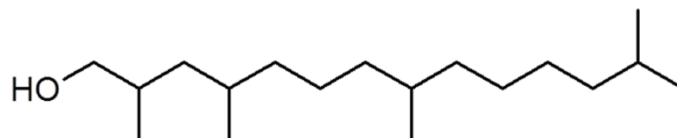
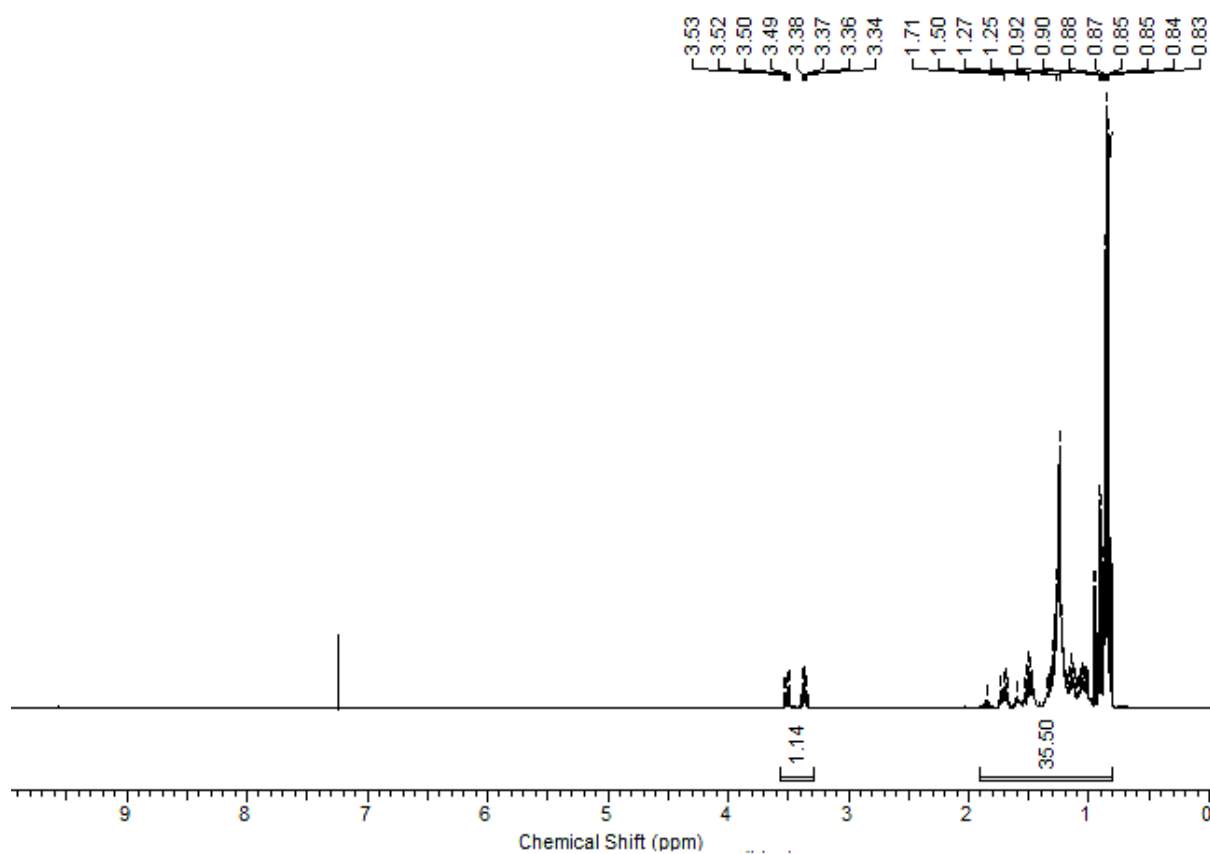
Espectro de RMN de ^{13}C do composto 14

Síntese do trifluorometonossulfonato de 3-bromo-2-metilpropila (16)**Espectro de RMN de ^1H do composto 16**

Espectro de RMN de ^{13}C do composto 16

Síntese do 1-bromo-2,7-dimetil-4-octino (18)**Espectro de RMN de ^1H do composto 18**

Espectro de RMN de ^{13}C do composto 18

Síntese do 2,4,8,13-tetrametiltetradecan-1-ol (20)**Espectro de RMN de ^1H do composto 20**

Espectro de RMN de ^{13}C do composto 20